

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DU GÈNE DE VERNALISATION2 (*VRN2*)  
CHEZ LE BLÉ HEXAPLOÏDE (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
AMADOU OURY DIALLO

SEPTEMBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Merci au bon Dieu pour m'avoir donné la santé et la force d'accomplir ce travail.

À mes parents, grands parents, oncles et tantes pour leurs amours, conseils, prières et les valeurs qu'ils m'ont données.

Au professeur Fathey Sarhan, mon directeur de recherche qui m'a honoré en me donnant l'opportunité de réaliser ce travail. Merci pour le soutien et l'aide précieuse dont j'ai pu bénéficier auprès de vous.

Aux professeurs Jean Danyluk et Mario Houde de leurs encadrements et orientations en acceptant de faire partie de mon comité de proposition de recherche.

Aux professeurs Normand Chevrier et François Dragon d'avoir accepté de faire partie de mon comité de rédaction de mémoire.

À mon collègue de laboratoire Ndjido Kane pour son soutien indéfectible et patience afin de mener à terme ce projet.

Aux Dre Zarha Agharbaoui, Dre Yoko Tominaga et Dre Helen Adams pour leur participation dans la réalisation de ce projet.

À mes très chers amis et collègues de laboratoire. Merci pour votre patience, compréhension, générosité et vos conseils.

Aux Dr François Ouellet, Francine Hamel, pour leurs conseils et encadrements.

À Marie Champoux et Karine Trambly pour leur assistance technique et tout le personnel des laboratoires de Fathey Sarhan, Mario Houde et Jean Danyluk.

À ma femme pour son amour son soutien moral et mon fils à qui je dédie cette réalisation, mes frères et sœurs, cousins et cousines pour leur amour et soutien moral.

## TABLES DES MATIÈRES

|   |    |
|---|----|
| LISTE DES FIGURES ET TABLES.....  | iv |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....  | v  |
| RÉSUMÉ.....   | vi |
| INTRODUCTION.....   | 1  |
| REVUE DE LITTÉRATURE.....   | 4  |
| 1. Réponses aux basses températures.....                                      | 5  |
| 1.1 L'acclimatation au froid.....   | 5  |
| 1.2 La vernalisation.....   | 7  |
| 2. Réponses à la photopériode.....  | 8  |
| 3. Bases moléculaires de la floraison.....                                    | 9  |
| 4. Les familles de facteurs de transcription en doigts de zinc et homéotiques |    |
| MADS-box.....   | 13 |
| 4.1 Généralités.....  | 13 |
| 4.2 Les facteurs de transcription en doigt de zinc.....                       | 14 |
| 4.3 Les facteurs de transcription MADS-box.....                               | 16 |
| HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.....   | 19 |
| ARTICLE.....  | 21 |
| ABSTRACT.....   | 22 |
| INTRODUCTION.....   | 23 |
| RESULTS AND DISCUSSION.....   | 25 |
| MATERIALS AND METHODS.....  | 31 |
| REFERENCES.....   | 38 |
| LEGEND OF FIGURES AND TABLES.....   | 41 |
| FIGURES AND TABLES.....   | 45 |
| CONCLUSION.....   | 57 |
| REFERENCES.....   | 61 |
| ANNEXE.....   | 68 |

## LISTE DES FIGURES ET TABLES

### Figures

- 1 Structure and promoter analysis of the three copies *TaVRN2* from *Triticum aestivum* cv Norstar
- 2 Expression analysis of *TaVRN2* during cold acclimation
- 3 Expression analysis of *TaVRN2* under photoperiod treatment
- 4 Tissue specificity and treatment with several abiotics stresses.
- 5 Temporal and spatial localization of *TaVRT-1*, *TaVRT-2* and *TaVRN2* from winter wheat (cv Norstar) during cold acclimation.
- 6 SDS-PAGE analysis of TaVRN2\_B recombinant protein
- 7 Mass spectrophotometry (MS/MS) analysis of TaVRN2 after digestion with trypsin.
- 8 Transrepression of *TaVRT-1* promoter activity using agrobacterium-transient expression assay in tobacco plants.
- 9 Phenotype of wild type and *TaVRN2* transgenic plants in *A. thaliana*
- 10 Level of the transgene expression in R1 (FIRST GENERATION) in *A. thaliana*

### Tables

- 1 Protein-protein interactions in yeast
- 2 Primers used for different experiments

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

|          |  |
|----------|--|
| Bp       | <u>b</u> ase <u>p</u> air  |
| cv       | <u>c</u> ultivar   |
| cDNA     | <u>c</u> omplementary <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid                               |
| DNA      | <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid   |
| gDNA     | <u>g</u> enomic <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid                                     |
| GFP      | <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein  |
| MS       | <u>m</u> ass <u>s</u> pectra   |
| mRNA     | <u>m</u> essenger <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid  |
| PCR      | <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction  |
| qRT-PCR  | <u>q</u> uantitative <u>R</u> eal- <u>t</u> ime <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction  |
| RNA      | <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid  |
| SDS      | <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate  |
| SDS-PAGE | <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate <u>p</u> olyacrylamide gel <u>e</u> lectrophoresis |
| tRNA     | <u>t</u> ransfer <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid   |

## RÉSUMÉ

Chez les plantes céréalières d'hiver, le temps de floraison est retardé jusqu'à ce que les conditions favorables de croissance arrivent. Ce retard est modulé par les basses températures via le processus de vernalisation. Ce processus est régulé par au moins deux gènes clés, *VRN1* et *VRN2*. Ces gènes sont caractérisés chez le blé diploïde (*Triticum monococcum*), un blé non cultivé. Le gène *VRN1* est aussi caractérisé chez le blé hexaploïde (*Triticum aestivum*) et il est nommé *TaVRT-1* (*Triticum aestivum Vegetative to Reproductive Phase 1*). Un troisième gène nommé *TaVRT-2* est identifié chez le blé hexaploïde. L'expression de ce gène durant le processus de la vernalisation est associée à la floraison. Cependant, les interactions entre ces trois gènes clés et leur rôle respectif durant le processus de vernalisation sont peu connus. Pour mieux comprendre leurs relations, nous avons cloné les trois copies de *VRN2* (*TaVRN2*) qui correspondent aux trois génomes A, B et D et déterminé leur patron d'expression durant la vernalisation chez le cultivar de blé d'hiver (cv Norstar) et celui de printemps (cv Manitou). Les résultats montrent que l'expression de *TaVRN2* est constitutive chez Manitou alors que son expression est négativement régulée durant le processus de vernalisation chez Norstar. Son expression est aussi régulée par la photopériode. Certains stress abiotiques comme le choc thermique, la déshydratation, le stress salin, les blessures et l'hormone ABA répriment son expression. L'analyse du promoteur révèle la présence d'éléments cis impliqués dans la régulation de ces stress abiotiques. Les études sur la spécificité et localisation tissulaire par hybridation *in situ* montrent que le gène s'accumule dans les jeunes feuilles et au niveau des cellules du méristème. La séquence codante de la copie B du gène *TaVRN2* a été clonée dans un vecteur pTrcHisB contenant une queue histidine et exprimée dans la bactérie *Escherichia coli*. La protéine recombinante est vérifiée par immuno-buvardage de type western en utilisant un anticorps Anti-His et l'identité de la protéine a été confirmée par séquençage au spectromètre de masse. Les études d'interactions protéiques en utilisant le système de double hybride chez la levure, révèlent que la protéine TaVRN2 interagit avec les protéines TaVRT-1 et TaVRT-2. Des expériences de transrépression du promoteur de TaVRT-1 fusionné avec GFP agissant comme gène rapporteur au niveau des feuilles de tabac et en utilisant la protéine TaVRN2 comme un effecteur ont été menées. Les résultats indiquent que TaVRN2 seul ne réprime pas l'activité du promoteur *Tavrt-1*. Cependant le complexe TaVRT-2 et TaVRN2 réprime l'activité du promoteur. La surexpression de *TaVRN2* chez *Arabidopsis thaliana* montre un retard de floraison chez les plantes transgéniques de plus de dix jours, ce qui suggère que TaVRN2 peut agir comme répresseur de la floraison chez les dicotylédones.

## INTRODUCTION

Les plantes nous nourrissent, produisent l'oxygène, nous fournissent matériaux, médicaments, vêtements et en plus, elles sont belles et agrémentent notre environnement de leurs couleurs et leurs odeurs. Comme toutes les espèces, les plantes assurent leur survie en se reproduisant. L'une des étapes fondamentales de leur reproduction est le processus de floraison. Ce faisant, les plantes contrôlent leur processus de floraison en tenant compte de certains facteurs dont l'environnement, la nutrition et le climat pour s'assurer que ce processus se fasse au moment opportun et dans les meilleures conditions. Le climat ou les facteurs environnementaux ont un impact important dans la reproduction et la survie. Dans les pays nordiques comme le Canada où le climat est très rigoureux, les basses températures entraînent des pertes économiques suite à une baisse de productivité agricole. L'application de la génétique moléculaire à l'étude de la floraison, l'analyse des mutants naturels et les études sur l'impact de l'intensité de la lumière et la qualité de la lumière chez *Arabidopsis thaliana* ont permis de mieux comprendre les différentes voies de régulation de la floraison (Fig.1, Blasquez 2000). Au cours de l'évolution le développement du système endogène des plantes a permis de pouvoir mesurer l'exposition au froid pendant une longue période de froid : un tel système aide les plantes à distinguer entre le printemps et les alternances thermiques qui ont lieu à l'automne (Sung et Amasino, 2005). Les gènes responsables de cette évolution pourront guider pour répondre à certaines des questions sur la physiologie des plantes, dont les questions sur : Comment les plantes détectent la durée du jour, le signal de longue distance transmis des feuilles jusqu'au sommet? Comment les plantes s'acclimatent aux changements de température? L'acclimatation au froid augmente le niveau de tolérance au gel et peut induire le processus de vernalisation lorsque l'exposition au froid est prolongée. Chez les céréales, les bases moléculaires de la vernalisation sont peu connues comparativement à *A. thaliana*. Ceci est principalement dû au fait que le



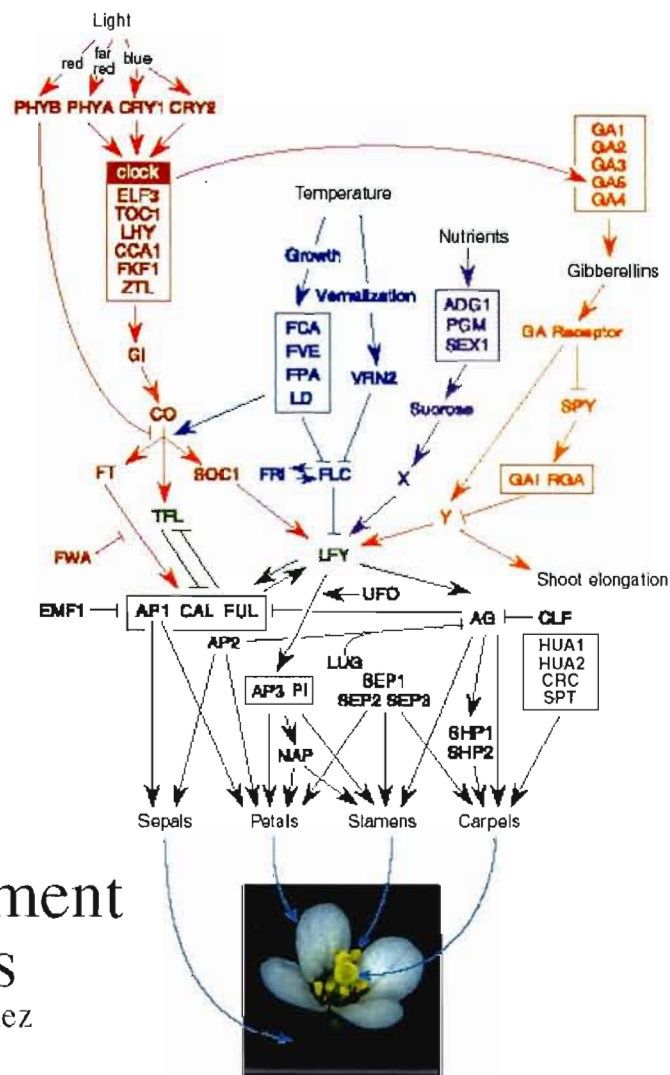
génotype qui implique cette réponse se situe à un caractère récessif (*vrn-A1*), à la complexité génétique des céréales et à la difficulté d'obtenir des mutants. D'où l'importance d'étudier les gènes responsables de la vernalisation chez les céréales.

Journal of  
Cell Science

# Flower Development Pathways

Miguel A. Blázquez

© Journal of Cell Science (2000) 113, 1354-1360



**Figure 1:** Model intégrateur des quatre différentes voies (photopériode, vernalisation, autonome et gibbérelline) avec les principaux gènes caractérisés et impliqués dans le développement des organes floraux chez *Arabidopsis thaliana* (Blázquez, 2000).

Dans le but d'acquérir une meilleure compréhension du processus d'acclimatation au froid et de vernalisation, cette étude présente la caractérisation moléculaire chez le blé hexaploïde du gène de vernalisation (*VRN2*) nommé *TaVRN2* (*Triticum aestivum Vernalisation2*) qui appartient à la famille de facteurs transcription doigts de zinc. Ce gène *VRN2* est identifié comme étant un répresseur floral chez *T. monococum* lors de la vernalisation (Yan et al., 2004b). Le clonage du gène majeur *TaVRT-1* (*Triticum aestivum Vegetative to Reproductive Phase-1*) ou *VRN1* (*Vernalisation 1*) chez *T. aestivum* dont l'expression est étroitement corrélée avec la réponse à la vernalisation, la transition florale et la tolérance au gel a permis d'amorcer cette compréhension (Danyluk et al., 2003). Ce gène code pour une protéine appartenant à la famille de facteurs de transcription MADS-box. Un second gène de la même famille, *TaVRT-2*, a été cloné et son expression a été étroitement associée à la réponse à la vernalisation (Kane et al., 2005). La caractérisation de *TaVRN2* permettra de mieux comprendre comment ces trois gènes importants sont impliqués dans la régulation de la floraison durant la vernalisation. L'identification de régulateurs comme marqueurs de floraison ou de tolérance de stress, la cartographie fine des zones chromosomiques d'intérêt agronomique, l'analyse fonctionnelle et l'utilisation de gènes régulés en réponse aux basses températures permettront à long terme de développer des cultures plus tolérantes, accroître la productivité agricole et permettre un plus vaste choix dans une région donnée.

## REVUE DE LITTÉRATURE

La présente étude a été faite chez le blé qui est la céréale la plus cultivée à travers le monde (22% des cultures céréalières) ainsi qu'au Canada. Le blé offre une meilleure tolérance vis-à-vis du froid et, est économiquement la plus importante; en plus il montre une grande variation génétique pour l'acclimatation au froid et la tolérance au gel, ce qui en fait un modèle intéressant en recherche génomique.

A l'instar de toutes les espèces, les plantes assurent leur survie en se reproduisant. L'une des étapes fondamentales de leur reproduction est le processus de floraison. Chez les plantes à fleurs, la transition entre les phases végétative et reproductrice dépend à la fois de signaux endogènes et de conditions environnementales favorables, comme par exemple des jours longs et une température suffisamment clémente. Ainsi, pour perpétuer leur espèce, les plantes s'assurent que la mise en place de ce processus de transition se fasse au moment opportun et dans les meilleures conditions. Ce synchronisme dépend cependant de facteurs endogènes et exogènes. Les facteurs endogènes induisent essentiellement des changements chimiques, biochimiques et physiologiques quand la plante atteint le moment de déclencher ce processus quant aux facteurs exogènes même s'ils produisent généralement les mêmes changements, ils sont induits par l'environnement de la plante. Les facteurs environnementaux sur lesquels nous allons élaborer sont les basses températures et la lumière du jour qui influencent énormément le processus de floraison. Les basses températures induisent les processus d'acclimatation au froid et de vernalisation tandis que la durée de lumière du jour influence la réponse photopériodique.

## 1. Réponses aux basses températures

La tolérance aux basses températures est identifiée comme étant le facteur limitant pour le développement des plantes. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé la capacité de percevoir ces basses températures et de s'acclimater au stress causé par cette exposition. Ce processus nommé acclimatation au froid permet à la plante d'être prête à affronter les périodes de gel et ainsi assurer sa survie. L'acclimatation au froid est initiée assez rapidement : les changements dans l'expression génétique ont lieu dans les minutes suivant l'exposition au froid (Thomashow, 2001). L'acclimatation au froid permet aux plantes d'élever leur niveau de tolérance au gel et la mise en place de la vernalisation. La vernalisation est un autre processus induit par le froid; il s'agit de « l'acquisition ou l'accélération de la capacité de fleurir suite à un traitement prolongé au froid » (Chouard, 1960). Contrairement à l'acclimatation au froid, la mise en place des mécanismes moléculaires de la vernalisation exige une longue période d'exposition au froid. Même si les deux voies de régulation sont induites par le même stress, les plantes y répondent avec des processus génétiques différents. L'acclimatation au froid induit des modifications cellulaires, métaboliques et génétiques conduisant à une tolérance au froid et au gel tandis la vernalisation en plus des modifications génétiques permet à la plante une transition de la phase végétative à la phase reproductive.

### 1.1 L'acclimatation au froid

L'acclimatation au froid est un processus qui a pour but de préparer la plante à subir le stress des températures basses. Ce processus est initié assez rapidement : les changements dans l'expression génétique ont lieu dans les minutes suivant l'exposition au froid (Thomashow, 1999). Selon Guy (1990), pendant la période hivernale, les plantes haussent leur niveau de respiration, de photosynthèse et de leur synthèse protéique. En 2001, Zhu rapportait que les basses températures diminuent l'adsorption de l'eau par les racines alors que le gel cause la formation de cristaux de

glace dans le milieu extracellulaire ce qui entraîne une limitation du potentiel hydrique. Durant le processus d'acclimatation, plusieurs modifications métaboliques, biochimiques, physiologiques et cellulaires sont induites permettant d'élever le niveau de la tolérance au gel (Pearce, 1999; Thomashow, 1999; Breton et al, 2000, Xin et Browse, 2000). Une des premières modifications notée est la déstabilisation des membranes plasmiques des plantes sensibles. Différentes parutions sur l'acclimatation au froid d'*A. thaliana* (Uemura et al, 1995), le blé et le seigle (Lynch et Steponkus, 1987) ont corrélé ces résultats. En plus les basses températures affectent la fluidité des membranes en augmentant leur rigidité. Cette baisse des températures réduit l'influx calcique impliqué dans la réponse cellulaire. Ceci affecte la stabilité des protéines structurales ce qui a pour conséquence de déstabiliser les interactions entre les composants cellulaires. Au niveau cellulaire, la formation de cristaux de glace dans le milieu intracellulaire est mortelle. Cependant, les plantes peuvent répondre en réduisant ce phénomène par la production de substances qui limitent la formation de cristaux de glace (Williams, 1992). Les basses températures induisent la formation de molécules protectrices (antioxydants, hormones, sucres, etc.) afin de limiter ou contrer l'impact de ce stress. Ces substances agissent en augmentant la pression osmotique dans le cytoplasme ainsi ils stabilisent les protéines et les membranes lors de stress salin et du froid (Bohnert et Shen, 1999; McNeil et al., 1999). De nombreuses molécules agissant comme osmoprotectants (sucres et proline (Hare et al., 1999), les polyamines (Kumar et Minocha, 1998) et la bétaine (McNeil et al., 1999). L'application exogène de la bétaine peut augmenter la tolérance au gel de 5°C chez le blé acclimaté ou non (Allard et al., 1998). En laboratoire des tests de cryoprotection démontrent que la bétaine peut protéger les liposomes, les bactéries, et les tissus des plantes pendant la congélation (Lloyd et al., 1994). En 1990, Guy rapportait que beaucoup de sucres participent à la stabilisation des membranes et des protéines suite à une déshydratation causée par les basses températures et la sécheresse. Ces propos sont corrélés par le fait qu'on observe une accumulation de sucres pendant le processus d'acclimatation (Yoshida et al., 1998).

En réponse à différents stress dont le froid, les plantes synthétisent l'hormone ABA (acide abscissique). Cette substance est impliquée dans le processus menant à la tolérance au gel (Breton et al., 2000). Une récente parution (Razem et al, 2006) révèle que l'hormone ABA est impliquée dans le contrôle la floraison chez *Arabidopsis thaliana* en liant de façon spécifique une protéine FCA une «RNA binding-protein». Cette protéine est joue un rôle majeur dans la régulation de la voie autonome de la floraison. Des tests, chez *Arabidopsis* révèlent une augmentation du niveau de l'ABA de deux à trois fois au cours de l'acclimatation au froid (Lâng et al., 1994). Comparativement à la bétaine, l'application exogène d'ABA n'induit que partiellement la tolérance au froid chez le blé et induit parfois un état de sénescence (Dallaire et al., 1994; Allard et al., 1998).

## 1.2 La vernalisation

Les plantes chez lesquelles la floraison est accélérée par la vernalisation sont souvent des bisannuelles ou des plantes annuelles d'hiver. Ces plantes fleurissent habituellement au printemps. Pendant la première saison de printemps, les plantes s'établissent, et au printemps suivant, elles fleurissent rapidement pour tirer avantage des conditions favorables et pour éviter la compétition. Pour que cette stratégie soit efficace, il importe que les périodes d'exposition au froid auxquelles la plante est exposée à l'automne ou tôt en hiver soient courtes pour ne pas déclencher la floraison (Sung et Amasino, 2005). Chez beaucoup de plantes, la durée de l'exposition au froid est aussi perçue pour s'assurer que le printemps soit réellement arrivé afin de stimuler la croissance des bourgeons. Des études classiques de greffage ont permis de confirmer que dans le processus de vernalisation, le sommet de la pousse est le site de perception du froid (Chouard, 1960). Il est aussi intéressant de noter que l'état de vernalisation de la plante est stable chez certaines plantes. Des études classiques ont démontré que les plants de la jusquiame noire bisannuelle en vernalisation qui ont poussé dans des photopériodes non inductibles après la vernalisation ne produisent pas de fleurs. Par contre, lorsque les plants qui poussent dans des photopériodes non

inductibles sont exposés à des photopériodes inductibles, elles fleurissent. Ceci démontre que chaque plant individuel de la jusquiame noire a la capacité de «se souvenir» de sa vernalisation antécédente (Lang et Melchers, 1947). Ceci veut donc dire que chaque plant acquiert la capacité de fleurir, mais ne produit pas de fleurs jusqu'à ce que les exigences de photopériode appropriées soient rencontrées. La vernalisation établit donc une mémoire cellulaire qui demeure stable malgré la division mitotique des cellules. En se basant sur ces résultats, il est raisonnable de se référer à cette acquisition de mémoire cellulaire par voie de la vernalisation comme interrupteur épigénétique. Plusieurs plantes répondent au processus de vernalisation et l'utilisent comme indicateur du passage de l'hiver et l'arrivée des conditions favorables du printemps. Ce processus de vernalisation n'initie pas directement la floraison, mais agit sur les processus biochimiques des cellules du méristème pour favoriser leur transition d'un état végétatif à un état reproductif. Chez les plantes bisannuelles, il faut généralement un traitement prolongé à basse température (0-5°C) pour induire la floraison. Il existe une relation quantitative entre le traitement au froid et la rapidité d'induction de la floraison (Napp-Zinn, 1987).

## 2. Réponses à la photopériode

Chez plusieurs plantes, la floraison est contrôlée par des signaux saisonniers qui s'assurent que la floraison se déroule au temps de l'année le plus propice à la production adéquate des graines. La durée du jour est un indicateur fiable du changement des saisons (Sung et Amasino, 2005) et la plupart des plantes peuvent suivre de près la durée du jour et se servir de ces informations pour contrôler leur développement, y compris la transition à la floraison. Au cours des dernières années, des recherches visant à comprendre le contrôle du temps de floraison chez *A. thaliana* ont été effectuées en utilisant des approches en génétique moléculaire. Des mutants fleurissant plus lentement que les plantes sauvages lorsqu'ils étaient exposés à des jours longs ont été identifiés. Il a été suggéré que ces mutants comportaient un défaut de détection ou de réaction à la durée du jour. Ils ont donc permis d'identifier

les gènes qui contrôlent ces processus. Aussi, des études récentes en génétique chez le riz ont facilité la comparaison des mécanismes de réaction à la durée du jour chez cette plante (Andersen et al., 2004).

### 3. Bases moléculaires de la floraison

Chez *A. thaliana*, six semaines de traitement au froid peuvent être requises pour atteindre le maximum de la réponse à la vernalisation (Koornneef *et al.*, 1991). Le gène *FLC*, qui code pour une protéine MADS-box, joue un rôle important dans cette réponse à la vernalisation. Ce gène est le principal régulateur de la floraison chez *A. thaliana* (Michaels et Amasino, 1999, Sheldon et al, 2000). Ce gène agit de façon synergique avec le gène *FRI* (*Frigida*) pour réprimer la transition florale. Des études de croisements entre phénotypes précoce et tardif a permis d'associer la réponse à la vernalisation avec la présence d'un locus monogénique, appelé *FRIGIDA* (*FRI*) (Koornneef et al., 1994). Le locus *FRI*, associé à la floraison tardive, porte un caractère dominant et son action peut être supprimée par une période d'exposition au froid (Napp-Zinn, 1987). D'autres régulateurs, à l'opposé, induisent la transition florale, par exemple: *GIGANTEA* (*GI*), *LEAFY* (*LFY*), (Weigel, 1995) et *CONSTANS* (*CO*), (Samach et al., 2000). Leur mutation ralentit ou bloque la transition florale. Le gène *AGL20* ou *SOC1* (*Suppressor of Overexpression of CO*) a été cloné et il code pour un facteur de transcription MADS-box. L'expression du gène *AGL20* est positivement régulée par la vernalisation et sa surexpression active la phase reproductive en supprimant l'effet combiné de *FRI* et *FLC*. De plus, *AGL20* est régulé par la voie photopériodique sous l'action directe de *CO*, mais aussi par la voie autonome par la répression de *FLC*. Le clonage *SOC 1* chez *A. thaliana* révèle que son expression est positivement régulée par la vernalisation, alors que un récent clonage par notre groupe de *TaVRT-2* chez le blé appartenant au sous-groupe de SVP ou STMADS11 (Kane et al 2005) montre que son expression est négativement corrélée par la vernalisation. Ce gène réprime donc la phase reproductive. Des études menées chez *A. thaliana* indiquent que des mutants *Vrn* dont le degré de méthylation



est réduit, régulent de façon négative le niveau de FLC et favorisent la transition florale. Ceci suggère que la vernalisation pourrait être régulée par l'état de méthylation (Sheldon et al., 2000 et Michaels et Amasino, 2001). De plus des agents déméthylant comme le 5-azacytidine peuvent partiellement substituer la vernalisation. En plus de la voie de vernalisation on a deux autres voies qui sont la voie de photopériode et la voie autonome. Les mutants de la voie photopériodique fleurissent tardivement en jours longs alors que ceux de la voie autonome fleurissent tardivement aussi bien en jours longs qu'en jours courts. Une quatrième voie de transition florale existe; c'est la voie de la gibbérelline (GA<sub>3</sub>) qui est une hormone essentielle au développement des plantes (Weigel, 1995), (Fig.1). L'identification du répresseur *FLOWERING LOCUS C (FLC)* chez *Arabidopsis* et de celui de *VERNALIZATION 2 (VRN2)* chez le blé nous permet de comprendre comment la vernalisation affecte la compétence du méristème (Sung et Amasino, 2005). Ces répresseurs inhibent la floraison en s'exprimant au niveau de l'apex et la vernalisation induit la floraison en inhibant leur expression au niveau de l'apex. Durant la vernalisation, la protéine FLC subit une série de modifications de son histone 3 (H3). Cela se traduit par la déacétylation de la lysine 9 (K9) et lysine 14 (K14) sur H3 suivi par une diméthylation de K27 et K9 sur H3. Sur les mutants *vrn1* le stade de répression de FLC n'est pas maintenu même si la diméthylation de K27 demeure ce qui suggère que la seule diméthylation de K27 n'est pas suffisante pour maintenir le stade de répression de FLC. Par contre chez les mutants *vrn1*, *vrn2* ou *vin3*, la diméthylation de K9 sur H3 évite de subir l'effet de la vernalisation. Ce résultat indique que la diméthylation de K9 sur H3 joue un rôle crucial dans la stabilité de la répression de FLC (Sung et Amasino, 2005). Cette série de modification serait à la base de la "mémoire" des plantes pour la reconnaissance de l'arrivée de temps froid durant la vernalisation. Le gène *CONSTANS (CO)* a été particulièrement utile pour mieux comprendre la réaction des plantes à la durée du jour. La protéine CO se situe dans le noyau, et encourage l'expression de d'autres gènes. Chez les plantes transgéniques, l'expression excessive de CO engendre une floraison très précoce. Chez les plantes

sauvages, CO n'est pas active à tout moment de la journée, mais est régulée plutôt par l'horloge interne de la plante, et donc l'ARNm de CO est produit seulement à partir de douze heures après l'aube jusqu'à environ l'aube le jour suivant. Pendant les jours plus longs de l'été, l'ARNm de CO est donc présent pendant la journée. Lorsque la protéine CO est produite à partir de cet ARNm, elle est stabilisée dans le noyau de la cellule et activera l'expression des autres gènes. En hiver, cependant, l'ARNm de CO est produit seulement la nuit car les jours comptent moins de douze heures. Lorsque la protéine est produite la nuit elle se décompose rapidement et n'active pas l'expression des autres gènes. La floraison d'*A. thaliana* a donc lieu pendant les jours longs au printemps et au début de l'été du à l'interaction entre le contrôle de l'expression de l'ARNm par l'horloge interne de la plante et son exposition directe à la lumière. Le gène CO du riz, appelé *HEADING DATE 1 (HD1)*, est aussi important pour contrôler la floraison. Cependant, chez cette plante, la fonction du gène a un effet inverse, et doit promouvoir la floraison pendant les jours courts et non pendant les jours longs. Cet effet a pu être imité en employant un système semblable, dans lequel la protéine CO est activée à la fin d'une longue journée, mais au lieu d'activer d'autres gènes comme elle le fait chez *A. thaliana*, HD1 semblerait inhiber l'activité des gènes chez le riz. Donc, HD1 inhiberait la floraison pendant les jours longs. Toutefois, les plantes fleurissent pendant les jours courts alors qu'il n'y a pas d'activité de HD1 (Andersen et al, 2004). La comparaison des systèmes chez le riz et *A. thaliana* fournit donc une indication de la façon par laquelle les diverses réactions des plantes pourraient avoir évolué à partir du même ensemble de composants principaux. Tôt après la découverte du photopériodisme, des travaux ont montré que les plantes détectaient la durée du jour à partir de leurs feuilles, et que puisque le développement des fleurs avait lieu au sommet de la plante, un signal de longue distance devait être transmis au sommet pour inciter le développement des fleurs. La nature de ce signal demeure encore inconnue, malgré plusieurs dizaines d'années de recherche. Il a cependant été démontré que le signal se faisait transmettre à travers le phloème, un système vasculaire qui relie les feuilles aux parties croissantes de la plante.

Récemment, il a été démontré que le gène *CO* était exprimé dans le phloème ainsi que dans d'autres tissus, et que l'activation spécifique de *CO* dans le phloème était suffisante pour assurer la promotion de la floraison au sommet (Andersen et al, 2004). Voilà qui suggère que *CO* agirait dans le phloème pour activer la synthèse ou le transport du signal systémique qui déclenche la floraison au sommet. Dans les cellules du phloème, *CO* active l'expression de beaucoup d'autres gènes, dont le plus sensible à l'activité de *CO* est un gène appelé *FLOWERING LOCUS T (FT)* qui avait déjà fait preuve d'avoir un effet sur la floraison. Ce qui est intéressant, c'est que *FT* code pour une toute petite protéine, et pourrait avoir les moyens de se déplacer à l'intérieur du phloème vers le sommet de la plante pour déclencher la floraison. En fait, l'expression du gène *FT* dans le phloème est suffisante pour déclencher la floraison, ce à quoi on pourrait s'attendre si *FT* était mobile en soi. De plus, il a déjà été confirmé que *FT* était relié de près à l'activation d'*APETALA1*, un gène qui agit au sommet pour promouvoir les premiers stades du développement des fleurs. Quoique le gène *FT* puisse lui-même être un signal mobile, il demeure possible que *FT* régule la synthèse de d'autres molécules dans le phloème et qu'elles représenteraient les signaux mobiles. Au niveau des céréales, un locus majeur de contrôle de la photopériode a été caractérisé chez l'orge, il est nommé Photopériode-H1 (*Ppd-H1*) (Turner et al 2005). Chez le blé d'hiver, il faut 49 jours d'exposition pour atteindre le point de saturation (Fowler et al, 1996). Quatre loci localisés sur deux chromosomes *Vrn-1* (5A), *Vrn-3* (5D), *Vrn-4* (5B) et *Vrn-5* (7B) contrôlent cette réponse (Galiba et al., 1995 et Fowler et al., 1996). Celui qui détermine le plus la réponse à la vernalisation est le locus *Vrn-1* ou *Vrn-A1* (Galiba et al., 1995 et Dubcovsky et al., 1998). Quant à ceux qui contrôlent la vernalisation chez le blé, ils sont sur ce locus *Vrn-1* (Roberts, 1990). Dès lors, l'identification des gènes portés sur ce locus se révèle être déterminante pour une meilleure caractérisation moléculaire de la vernalization.

## 4. Les familles de facteurs de transcription en doigts de zinc et homéotiques MADS-box

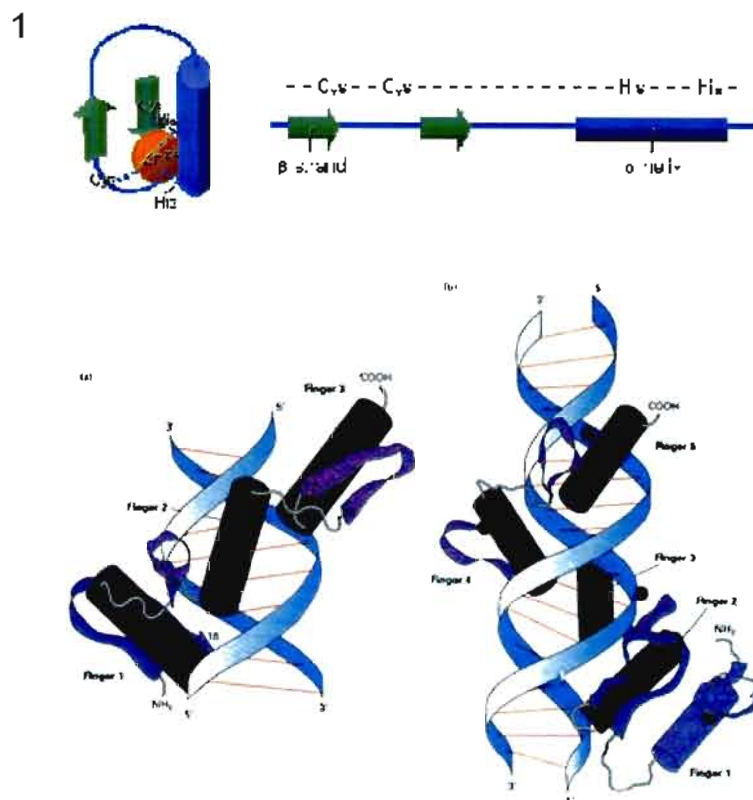
### 4.1 Généralités

Des études sur la croissance et le développement des plantes ont montré que ces dernières utilisent la régulation des facteurs de transcription pour contrer les impacts des stress abiotiques. C'est probablement une raison majeure qui fait que les plantes allouent une grande portion de leur génome aux facteurs de transcription. Plus de 1500 gènes identifiés chez *Arabidopsis* et le riz sont des facteurs de transcription (Goff et al., 2002).

Les facteurs de transcription sont des protéines qui régulent la transcription de gènes en se fixant sur leur promoteur au niveau des sites de liaison. Ils reconnaissent généralement des petites séquences d'ADN conservées contenues au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Certains de ces facteurs et de ces séquences sont communs à plusieurs gènes et utilisés de manière constitutive, et d'autres sont spécifiques à des gènes et leur activité est régulée spécifiquement. Après l'ouverture de la chromatine, un facteur de transcription doit dans la plupart des cas interagir avec les zones de régulation du promoteur pour activer ensuite la transcription. Un facteur de transcription possède des sites de liaison spécifiques sur l'ADN. On peut déterminer expérimentalement les sites de fixation à l'ADN d'un facteur de transcription. Ces séquences sont courtes et assurent la spécificité du facteur puisqu'elles sont présentes dans certaines zones de régulation et pas dans d'autres. Elles sont constituées la plupart du temps de la juxtaposition de plusieurs domaines protéiques. L'association produit un élément tridimensionnel qui sera capable d'interagir avec l'ADN. Les domaines de liaison à l'ADN peuvent être regroupés en familles par exemple : celles riches en leucine (bZIP), les MYB-like, les MADS-box, celles à hélices ailées (bHLH) et les protéines en doigts de zinc, famille à laquelle appartient le gène de vernalisation *VRN2*.

## 4.2 Les facteurs de transcription en doigt de zinc

Certains facteurs de transcription, comme les homéodomaines (doigts de zinc) ou les domaines bHLH ont des rôles bien précis dans le développement. Ce type de protéines comporte des éléments répétitifs avec une forme de doigts de gant. On peut retrouver de nombreux doigts. Ainsi, la protéine Sp1 qui se fixe sur les boîtes GC possède trois doigts de zinc. L'ion  $Zn^{2+}$  sert à stabiliser le motif sous forme de doigt. Le motif à doigts de zinc comprend le domaine de liaison à l'ADN. Il a été caractérisé dans un premier temps sur le facteur TFIIIA, qui est nécessaire à la transcription des gènes ARNr 5S par l'ARN pol III. Ces protéines tirent leur nom de leur structure, dans laquelle un groupe d'acides aminés conservés lie un ion de zinc. Deux sous-familles de ces protéines sont connues : la famille classique à doigts de zinc et la famille des récepteurs nucléaires. Une protéine à doigt de zinc comporte typiquement une série de doigts de zinc, dont la séquence consensus pour un doigt est la suivante : **Cys-X2-4-Cys-X3-Phe-X3-Leu-X2-His-X3-His**. Le motif tire son nom de la boucle d'acides aminés qui dépasse du site de liaison de l'ion zinc et est décrit comme le doigt Cys2/His2. Ce type de doigt de zinc est le facteur de transcription le plus retrouvé chez les eucaryotes. Essentiellement, les doigts de zinc s'attachent sur une grande variété de composants comme les acides nucléiques, les petites protéines, et stabilisent certaines molécules (Kozaki et al., 2004). Chez les mammifères, cette famille de facteurs de transcription est impliquée dans la différenciation sexuelle et au cours du développement (Cook. T., 2000). La figure ci-dessous représente l'organisation en deux et trois dimensions de la sous-famille (Cys2/His2) qui est la plus caractérisée.



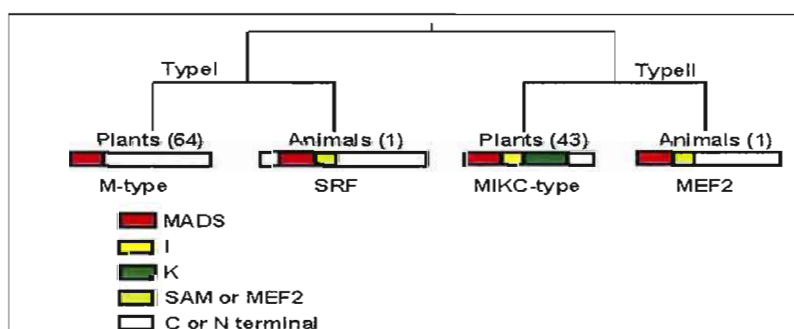
**Figure 2 :** Organisation structurale de la sous-famille (Cys2/His2) de facteurs de transcription doigt de zinc. La section 1 représente l'organisation en deux dimensions ([myhome.hanafs.com/~s9euno/ch3-1.htm](http://myhome.hanafs.com/~s9euno/ch3-1.htm)). La section 2 représente l'organisation en trois dimensions du facteur de transcription en liaison avec l'ADN ([homepages.bw.edu/~mbumbuli/molbio/zincf/zif/](http://homepages.bw.edu/~mbumbuli/molbio/zincf/zif/)).

Le clonage du gène *VRN2* chez *T. monococcum* (Yan et al 2004) révèle que ce gène appartient à une famille de facteurs de transcription de doigt de zinc et que son expression est réprimée durant la vernalisation. Ce gène comporte deux exons et un intron. Au sein de cette famille de gènes, on distingue différents motifs consensus à savoir un motif de 43 acides aminés appartenant aux protéines CO, CO-like et TOC1 (CCT domaine). Ce domaine détermine la localisation nucléaire du gène CO, un gène

clé dans la voie photopériodique d'*A. thaliana*. On attribue au gène *VRN2* un rôle de répresseur de la floraison. Cette action est obtenue en inhibant le gène *TaVRT-1 / VRN1* lors de la transition florale suite à un processus de vernalisation (Yan et al. 2004b). Cependant une parution récente de notre groupe de recherche montre qu'un autre gène appartenant à la famille MADS-box (*TaVRT-2*) joue un rôle similaire que *VRN2* en ce qui concerne l'inhibition de l'activité de *TaVRT-1/VRN-1* (Kane et al., 2005). Ces résultats suggèrent une possible relation entre *TaVRT-2* et *TaVRN2* au moment de leur action sur *TaVRT-1*. Des études récentes suggèrent que ces deux gènes agissent dans la même direction et qu'ils se relaient. Dans une première phase on aurait l'action de *VRN2* sur *TaVRT-1* et dans une seconde et importante phase on aurait l'action de *TaVRT-2* sur *TaVRT-1/VRN1*.

#### 4.3 Les facteurs de transcription MADS-box

MADS désigne l'acronyme pour les premiers membres identifiés de cette famille : M pour le gène de levure *Minichromosome maintenance 1* (Ammerer, 1990), A pour *AGAMOUS* chez *Arabidopsis* (Yanofsky et al., 1990), D pour *DEFICIENS* chez *Antirrhinum* (Sommer et al., 1990) et S pour *Serum Response Factor* chez l'humain (Norman et al., 1988).

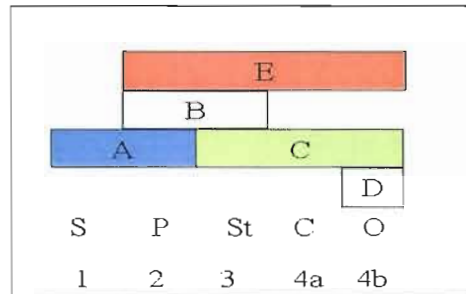


**Figure 3 :** Représentation générale et structurale des deux types de la famille de facteurs de transcription MADS-box et leur nombre chez les plantes et les animaux ([www.pdg.ethz.ch/research/mads/MADS.jpg/image](http://www.pdg.ethz.ch/research/mads/MADS.jpg/image)).

Leur organisation structurale est caractérisée en plus du domaine MADS, par une région intermédiaire (I), un domaine K et les extrémités terminales. L'extrémité N-terminale est à prédominance hydrophile et une partie de cette région serait nécessaire à la spécificité de liaison sur l'ADN (Shore et Sharrocks, 1995). Le domaine MADS, composé en moyenne de 56 résidus d'acides aminés, consiste en une paire d'hélices alpha anti-parallèles. La région I code pour un domaine très variable d'environ 30 acides aminés. Le domaine K code pour une région conservée de 70 acides aminés formant une structure enroulée sur elle-même comme celle retrouvée dans la kératine, d'où le nom K-box. Il contient une  $\alpha$ -hélice amphipatique capable de dimériser avec un autre domaine K. Il est absent chez l'humain et les levures et serait à l'origine d'une divergence phylogénique entre les types I et II chez les MADS-box de plantes (Alvarez-Buylla et al., 2000). L'extrémité C-terminale est la moins conservée chez cette famille de gènes MADS-box. Région à prédominance hydrophobe, elle est indispensable pour la liaison à l'ADN (Shore et Sharrocks, 1995). Le domaine C pourrait être impliqué dans l'activation de la transcription ou la formation de complexes multimériques entre facteurs de transcription. Le type I est caractérisé généralement par un exon unique et ne possède pas de domaine K tandis que les gènes du type II sont spécifiés par ce domaine K et possèdent en moyenne 7 à 8 exons (Alvarez-Buylla et al., 2000; De Bodt et al., 2003a) et Fig.3.

Les gènes MADS-box sont des gènes homéotiques. Ils jouent un rôle majeur dans la transduction de signaux vers le méristème en développement et surtout au niveau de la transition florale (Johansen et al., 2002). Les facteurs de transcription MADS-box sont impliqués dans la formation et le développement d'organes floraux (Fig.4).





**Figure 4 :** Le modèle ABCDE est une extension du modèle ABC postulé par Meyerowitz en 1991. Ce modèle décrit cinq classes de gènes qui sont responsables de la spécification de l'identité des organes floraux à partir d'une certaine combinaison. La classe A est requise pour les sépales (S), ABC ensemble sont requises pour les pétales (P), BCE pour les Étamines (St), CE pour les carpelles (C) et D le plus souvent avec C et E c'est pour déterminer les ovules (O) ([www.dbp.science.ru.nl/our%20research.htm](http://www.dbp.science.ru.nl/our%20research.htm)).

## HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Le gène majeur qui induit la transition florale suite au processus de vernalisation chez *T. aestivum* est *TaVRT-1/VRN1* (Danyluk et al. 2003). L'objectif de ce projet est de connaître le ou les gènes répresseurs de ce gène majeur chez *T. aestivum* afin de comprendre comment *TaVRT-1/VRN1* est régulé. *TaVRT-1* code pour une protéine appartenant à la famille de facteurs de transcription MADS-box. En plus la majorité de gènes caractérisés et impliqués au niveau du processus du développement et l'identification des organes floraux chez *A. thaliana* sont des MADS-box (Fig.1 et Fig.4). Chez le blé diploïde (*Triticum monococcum*) un blé non cultivé, un récent clonage du gène de vernalisation 2 (*VRN2*) ou *ZCCT1* révèle que ce gène a une relation épistatique durant la vernalisation avec *VRN1/TaVRT-1* et que ce gène jouerait un rôle de répresseur sur *VRN1/TaVRT-1* (Yan et al., 2004). Quant à *VRN2*, il code pour une protéine appartenant à la famille de facteurs de transcription doigt de zinc. En se basant sur ces résultats, l'hypothèse de ce projet s'est articulée sur le fait que le ou les gènes répresseurs de la floraison chez le blé *T. aestivum* devraient être des gènes appartenant à la famille de facteurs de transcription MADS-box ou que le gène *VRN2* serait un des répresseurs de *TaVRT-1*. Pour vérifier cette hypothèse, une quarantaine de gènes MADS-box ont été isolés de la banque cDNA de blé d'hiver acclimaté (cv Norstar). Une analyse préliminaire de séquences des gènes en comparaison avec ceux d'*A. thaliana* a été faite dans le but de les associer aux différents sous-groupes dont des fonctions ont été attribuées au courant du processus de floraison chez *A. thaliana* (Tab.1 en Annexe). Cette première phase d'analyse a permis d'aider à faire un choix sur *TaVRT-2* dont la caractérisation a révélé qu'il aurait un rôle de répresseur direct de *TaVRT-1* (Kane et al., 2005, et Kane et al., 2006). Parallèlement nous avons procédé à la caractérisation du gène *VRN2* chez le blé (*Triticum aestivum*) ou *TaVRN2* afin de vérifier son éventuel rôle de répresseur de *TaVRT-1*. La caractérisation de *TaVRN2* va permettre de vérifier

l'hypothèse selon laquelle, ce gène a un rôle de répresseur de *TaVRT-1*. Cette caractérisation est faite en utilisant des méthodes d'analyse de PCR en temps réel pour les patrons d'expression, de production de la protéine recombinante, des tests d'interaction protéines-protéines dans le système double hybride de la levure, de transactivation sur le promoteur de *TaVRT-1* au niveau des plantes de tabac, de surexpression sur *A. thaliana*, de localisation tissulaire par l'hybridation *in situ*, et par des gels de retardement de la protéine recombinante TaVRN2 avec comme sondes certains fragments des promoteurs de *TaVRT-1* et *TaVRT-2*. Ces fragments sont choisis en fonction d'éléments Cis régulateurs des stress abiotiques ciblés dans ce projet. Ces résultats et ceux des expériences en cours permettront de mieux comprendre comment ces trois gènes (*TaVRT-1/VRN1*, *TaVRN2* et *TaVRT-2*) communiquent et de trouver une voie de signalisation qui expliquerait comment ils interagissent lorsqu'on expose les plantes au froid. Ce qui nous permettra d'élaborer les relations entre les deux gènes MADS-box chez le blé (*T. aestivum*), *TaVRT-1/VRN-1* et *TaVRT-2* et le gène *TaVRN2* en réponse à l'acclimatation au froid, la vernalisation et la transition florale.

**ARTICLE**

**THE VERNALIZATION GENE *VRN-2* IN HEXAPLOID WHEAT  
(*TRITICUM aestivum* L.): MOLECULAR CHARACTERIZATION  
AND REGULATION STUDIES**

Diallo, A.O; Kane, N.A. Agharbaoui, Z. and F. Sarhan

Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Case  
Postale 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

## ABSTRACT

Flowering time in winter cereals is delayed until the favourable growth conditions arrive. This delay is modulated by low temperature through the process of vernalization. This process is regulated at least by two key genes, *VRN1* and *VRN2*. These genes have been characterized in the diploid wheat (*Triticum monococcum*). *VRN-1* is also characterized in the hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) and named *TaVRT-1*. *VRN2* gene encodes a transcription factor belonging to the zinc finger family. A third gene named *TaVRT-2* was also identified from hexaploid wheat. This gene is associated with flowering through vernalization response. However, the interaction between these three key genes and their putative function during vernalization are still unknown. To understand this relationship we cloned the three *VRN2* copies that correspond to genome A, B and D and determined their expression patterns using qRT-PCR during vernalization in both spring and winter wheat. The *VRN2* genes were constitutively expressed in the spring cultivar, but repressed during vernalization in the winter one. Its expression is down regulated under short day compared to long day. These genes were also repressed by several abiotic stresses such as heat shock, water stress, sodium chloride stress, wounding and the plant hormone ABA. Promoter analysis indicates the presence of several putative cis-acting elements involved in drought, abscisic acid, light and heat stress responsiveness. The tissue localization and *in situ* hybridization show that *TaVRN2* transcripts accumulate in young leaves and apical meristem. *TaVRN2* B open reading frame was cloned in pTrcHis\_B vector containing polyhistidine tag and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein was verified by western blot using anti-HisTag Antibody and the identity was confirmed by tandem MS/MS sequencing. Protein-protein interaction using yeast two hybrid system shows that TaVRN2 interacts with TaVRT-2 and TaVRT-1. Transactivation experiment in *N. benthamiana* using TaVRN2 protein as effector (transrepressors) and *TaVRT-1* promoter fused to GFP as reporter gene indicate that TaVRN2 alone does not repress *TaVRT-1*. However, the complex TaVRT-2 and TaVRN2 repress the activity of *TaVRT-1*. Overexpressing *TaVRN2* in *Arabidopsis* delayed flowering by one week, suggesting that wheat *TaVRN2* could also act as a flower suppressor in dicot species.

## INTRODUCTION

Plants respond to a variety of environmental signals such as temperature, light duration and light quality, which in some species are cues for the transition from vegetative to reproductive phase and the induction of flowering. Molecular and genetic analyses in the dicot model plant species *Arabidopsis thaliana*, a long day (LD) plant, revealed that four major genetic pathways regulate this transition and the induction of flowering (Blazquez et al. 2000). The photoperiod and vernalization pathways mediate responses to environmental inputs, such as, day lengths and low temperature. The autonomous pathway, originally thought to control flowering independently of environmental cues, appears to incorporate ambient temperature information (Blazquez et al. 2000). The major photoperiod responsive gene *CONSTANS* (*CO*) is strictly controlled by circadian rhythm and activated by LD and promotes the transcription of two central genes involved in the floral transition, *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) (Samach et al. 2000; Kardailsky et al. 1999). The *CO* protein regulate directly the expression of *FT*, this action is controlled by the circadian clock and light conditions (Kobayashi et al. 1999; Suárez-López et al., 2001; Yanovsky and Kay, 2002; Valverde et al., 2004). Although these four major pathways explain much of the flowering behaviour of *Arabidopsis*, it is also known that other factors such as overcrowding, low nutrients, sucrose supply (Ohto et al. 2001), drought, ethylene (Ogawara et al. 2003) and pathogen infection (Veronese et al. 2003, Martínez et al. 2004) can significantly alter the timing of flowering. The transition to flowering occurs at the shoot apex; however, most of the genes affecting the timing of floral induction are expressed throughout the plant. However, there are differences between the components of the flowering pathway in cereals and *Arabidopsis*. So far the *FLC-Like* genes were identified only in Brassicaceae (Becker and Theissen, 2003), and the identification of a floral repressor *Vrn-A<sup>m</sup>2* gene in *T. monococcum* reveals that it encodes a substantially diverged member of zinc-finger family of transcription factors

present only in temperate cereal species (Yan et al., 2004). In winter cereals, flowering time is delayed until the favourable growth conditions arrive. This delay is modulated by low temperature through the process of vernalization. The cloning and characterization of *Vrn-A<sup>m</sup>1* from *Triticum monococcum* (Yan et al., 2003) and *TaVRT-1* (*Triticum aestivum* **V**egative to **R**eproductive **T**ransition **1**) from *Triticum aestivum* (Danyluk et al., 2003) provide the opportunity to decipher the floral inductive pathway in cereals. The genetic analysis and the expression profiling of *Vrn-A<sup>m</sup>1*/*TaVRT-1* showed that the transcript accumulation is associated with the vernalization response, the transition from the vegetative to the reproductive phase, the expression of cold-regulated (COR) genes and the freezing tolerance (FT). This gene encodes a MADS-box protein that belongs to the AP1/SQUA-like clad of transcriptional regulators whose members have been implicated in functions such as determining inflorescence meristem identity and flower development. The recent cloning of *TaVRT-2* (*Triticum aestivum* **V**egative to **R**eproductive **T**ransition -2) showed that this gene is a potential repressor of the floral inductive pathway in hexaploid wheat (Kane et al., 2005). The putative role of this gene is to regulate the transition from the vegetative to the reproductive phase. The cloning of *VRN2* in *Triticum monococcum* named *ZCCT*, a gene that encodes a zinc finger transcription factor reveals that the down-regulation of *ZCCT* gene during vernalization was concomitant with the up regulation of *TaVRT-1*/*VRN1* (the same as to *API* in *Arabidopsis thaliana*) transcripts. These opposite regulations are consistent with the epistatic interactions between *VRN1* and *VRN2* (Yan et al, 2004). However, the molecular interaction and regulation of *TaVRT-1*, *TaVRT-2* and *TaVRN2* is still unclear in hexaploid wheat.

To understand the relationship between these three genes, we first isolated the three *TaVRN2* copies corresponding to the genome A, B and D and determined their expression patterns. The features of *TaVRN2* and its putative function during vernalization in relation to *TaVRT-1* and *TaVRT-2* are discussed.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Molecular and structure analysis of *TaVRN2* genes

In this work we characterized *VRN2* gene from hexaploid wheat that we named *TaVRN2*. This gene encodes a protein that belongs to the zinc finger family. Search in the public databases revealed that, *TaVRN2* is composed of two exons and one intron. Structural analysis of the proteins indicates the presence of a zinc finger domain located in the first exon and a CCT (CONSTANS, CONSTANTANS-like and TOC) domain in the second exon. The zinc finger domain is involved in DNA binding while the CCT domain is involved in protein binding (Fig.1\_A). The CCT domain is conserved in zinc finger proteins in cereals. However, the CCT domains from the ZCCT genes belong to a group that does not include any *Arabidopsis* protein (Yan et al., 2004). Three copies of *TaVRN2* were identified corresponding to the three genomes of *Triticum aestivum*.L (A, B and D). The difference between copy A and copy B is a deletion of one amino acid (His\_49) while the difference between copy A and copy D is a deletion of 7 amino acids (His\_49 to His\_55) (Fig.1.B). Copy A and B were isolated from a cDNA library and copy D from genomic DNA (gDNA) due to its low abundance in the cDNA library (Fig.2.B). Expression analysis of the D copy transcript using qRT-PCR indicates a similar expression pattern as *TaVRN2\_A* and *TaVRN2\_B* (Fig.2.). The *VRN2/TaVRN2* gene was initially mapped on chromosome 5A, in a small F population from the cross between spring (no.DV92) and winter (no. G3116) accessions of diploid wheat *T. monococcum* (Yan et al., 2004). *TaVRT-1* is located in the phenotypically defined *Vrn-A1* region on chromosome 5A (Danyluk et al., 2003), *TaVRT-2* was mapped to the short arm of the group-7 chromosomes (Kane et al., 2005).



### **Effect of low temperature and photoperiod on *TaVRN2* expression**

Expression analysis of *TaVRN2* indicates that this gene is regulated by low temperature (LT) in the winter genotypes. Its expression is high during the early stage of LT exposure but starts to decline toward the vernalization saturation point (Fig.2). This down-regulation of *TaVRN2* by vernalization is associated with the up-regulation of *TaVRT-1* (Danyluk et al, 2003). These opposing patterns suggest an interaction between *TaVRT-1* and *TaVRN2* products acting in opposite manner in the flowering pathway. Recently, another gene named *TaVRT-2* was cloned by our group. This gene has similar expression pattern as *TaVRN2* under LT and during the transition between the vegetative to reproductive phases (Kane et al, 2005). The down-regulation of *TaVRN2* (Fig.2.) and *TaVRT-2* (Kane et al.2005) genes during vernalization was concomitant with an increase in wheat *TaVRT-1/VRN1* expression (Danyluk et al. 2003). These opposite transcription patterns are consistent with the epistatic interactions between *TaVRT-1/VRN1* and *VRN2/TaVRN2* (Yan et al., 2004).

*TaVRN2* transcript is highly expressed in winter wheat under long day compared to short day during cold acclimation (Fig.3.). These results show that *TaVRN2* is repressed by short day under LT exposure. On the other hand expression analysis shows that *TaVRN2* transcript does not accumulate in spring wheat during cold acclimation. Our study shows that under short day conditions and low temperature, the accumulation of *TaVRN2* transcripts is related to the vernalization (Fig.2.). This accumulation has more effect when plants are grown under long day conditions (Fig.3 and Fig.2.). These results suggest that photoperiod has more effects on *TaVRN2* than vernalization. This suggestion is supported by a recent publication that reported that vernalization has a greater effect on *VRN1* (*HvVRN1*) than *VRN2* (*HvVRN2*) and photoperiod has higher effect on *VRN2* (*HvVRN2*) than *VRN1* (*HvVRN1*). However, the result of each environmental cue is dependent on the genetic background of the cultivars tested (Trevaskis, et al. 2006).

### **Tissue specificity**

The qRT-PCR analysis indicates that *TaVRN2* transcripts accumulate to higher level in leaves compared to crown and roots. The maximum accumulation level is found at 6 days of non acclimated leaves. When plants are acclimated, the level of *TaVRN2* transcripts decline and reached the lowest level at 36 days. *TaVRN2* transcripts were present in the leaves from the unvernallized winter wheat (cv Frederik) but declined to undetectable level after vernalization (Fig.4.A). This may suggest that the signal is perceived by the leaves and results in the repression of *TaVRN2* transcription. This repression is higher when approaching the vernalization saturation point (Fig.4. A). These results are confirmed by *in situ* hybridization analysis where the signal corresponding to *TaVRN2* transcripts is localized in the shoot apical meristem and young leaves surrounding the shoot apices. However, *TaVRN2* signal was lower than *TaVRT-2* in these cells. The temporal and spatial transcripts accumulations are associated to the vernalization response (Fig.5.). *TaVRT-1* was localized in the same cells suggesting that *TaVRN2*, *TaVRT-2* and *TaVRT-1* exert their action in the same cells.

### **Expression of *TaVRN2* gene in response to low temperature and other abiotic stresses**

Promoter analysis shows the presence of several putative cis-elements that are involved in abscisic acid responsiveness, in light responsiveness, in cold stress, in heat stress responsiveness and in drought-inducibility (Fig.1. C). Expression analysis using qRT-PCR analysis revealed that the *TaVRN2* transcripts accumulate upon exposure to LT and are repressed by abscisic acid (ABA) treatment, heat shock (HS), salt (NaCl), wounding (W) and dehydration. *TaVRN2* promoter analysis shows the presence of several cis-elements involved in response to several abiotic stresses tested. These results could explain the presence of the cis-elements related to these stresses in *TaVRN2* promoter (Fig.1.C and Fig.4.B). The effect of water stress under long day conditions was examined. However, and in spite of the down regulation of

*TaVRN2*, no difference was found in flowering time between the control and the water stressed plants. All over this result suggests that *TaVRN2* is not the only flowering repressor in hexaploid wheat and led to the hypothesis that there is another important repressor of *TaVRT-1 /VRN1* (Dubcovsky et al., 2006).

### **Recombinant protein production**

The open reading frame *TaVRN2\_B* protein was expressed as His-tagged fusion proteins in *Escherichia coli* and verified by Western blot using the anti-His antibody (Fig.6 B). The bacterial extracts analysis by SDS-PAGE shows that *TaVRN2* encodes a protein of 24 kDa (Fig.6 A). The identity of the protein was confirmed by the Mass Spectro (MS/MS) sequencing (Fig.7).

### **Protein-protein interactions**

To verify if *TaVRN2* can interact with other MADS-box proteins involved in the vernalization pathway and other zinc finger proteins, we used the yeast two-hybrid system. Fusion constructs were made with the GAL4 binding domain (BD) and GAL4 activation domain (AD) using different proteins. The results show that *TaVRN2* interacts with *TaVRT-1* and *TaVRT-2* but with higher affinity with *TaVRT-2*. The interaction of *TaVRT-1* and *TaVRT-2* proteins with another wheat zinc-finger protein, *TaHD1*, was also tested, and the results indicate that the proteins interact with each other but with lesser affinity (Tab.1). These data indicate that *TaVRN2* interacts with other MADS-box transcription factors (*TaVRT-1* and *TaVRT-2*) involved in flowering control and vernalization in wheat. This suggests that the transition from vegetative to reproductive phase may be modulated by a complex of *TaVRT-2* and *TaVRN2* and *TaVRT-1*.

### Transactivation study and gel shift assay

The similarity of *TaVRN2* and *TaVRT-2* expression pattern suggests that the two genes may act as a complex. The fact that *TaVRT-1* has an opposing expression pattern to *TaVRT-2* and *TaVRN2* raises the question of how these two genes (*TaVRT-2* and *TaVRN2*) act when repressing the activity of *TaVRT-1*. It is possible that the two gene transcripts may form a complex when repressing the activity of *TaVRT-1*. This hypothesis was verified by the transrepression of *TaVRT-1* promoter with the complex *TaVRN2* /*TaVRT-2* in *N. benthamiana*. Results of this study show that *TaVRT-1* protein does not repress the activity of its promoter (Fig.8.A.1). A similar result was obtained with *TaVRN2* protein (Fig.8.A.2). In contrast, the binding of *TaVRT-2* protein represses *TaVRT-1* promoter activity (Fig.8.A.3). The repression was much higher when the complex *TaVRT-2* and *TaVRN2* proteins were used as effector (Fig.8.A\_4). These results were verified by Western blot using anti-GFP antibody (Fig.8.B). Based on these results, we hypothesize that *TaVRN2* is not a direct repressor of *TaVRT-1*. However *TaVRN2* could enhance the action of *TaVRT-2*. A second hypothesis could be proposed to explain the regulation of *TaVRT-1/VRN1*. This hypothesis suggests a two-step regulation that involved two repressors acting at different time to regulate *TaVRT-1*. These two repressors are *TaVRT-2* and *TaVRN2*. One of them interacts with the CarG-box located in the *TaVRT-1/VRN1* promoter which is the most likely regulatory site of *TaVRT-1/VRN1* (Dubcovsky et al., 2006). As a MADS-box family member, *TaVRT-2* may interact with the CarG-box located in the *TaVRT-1* promoter. A gel shift assay confirms this assumption. *TaVRT-2* protein provides a specific binding to a CarG-box located in *TaVRT-1/VRN1* promoter (Kane et al., unpublished data) but no binding was found with *TaVRN2* protein. These results combined with the transrepression assay and protein-protein interaction support the hypothesis that, *TaVRT-2* is the direct repressor of *TaVRT-1/VRN1* and not *TaVRN2*.

### Overexpression of *TaVRN2* in *A. thaliana*

The fact that *ZCCT1/TaVRN2* delays flowering in wheat (Yan et al., 2004) was tested by overexpressing *TaVRN2* in *A. thaliana*. Preliminary analysis of first generation indicates that *TaVRN2* transgene delays flowering by more than 10 days in *A. thaliana* (Fig.9 and Fig.10). These results suggest that *TaVRN2* could acts as a repressor in other species. It would be interesting to determine if *TaVRN2* acts as a universal repressor. That could be used to modulate flowering in economically important species. The impact of the transgene on the flowering genes will be evaluated to determine the mechanism by which *TaVRN2* delays flowering in *A. thaliana*.

When we combined all the results from expression studies, protein-protein interactions and the overexpression in *A. thaliana* we can not dined the second hypothesis. This hypothesis suggests that *TaVRN-2* and *TaVRT-2* act in two steps when repressing the activity of *TaVRT-1*. The first step in the early stage of the repression of *TaVRT-1/VRN1* carried by *TaVRN2* and the second and most important step is carried out by *TaVRT-2*. To confirm this hypothesis work is in progress to test *TaVRN2* promoter activity in tobacco. We will test the activity of this promoter in fusion of GFP as reporter gene. We will also test this fusion activity in presence of TaVRT-1 and TaVRT-2 proteins and in responses to several abiotic stresses.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and growth conditions

Spring wheat cultivar *Triticum aestivum* L. (Manitou) and the winter wheat cultivar (Norstar) were used in the comparative gene expression studies. Plants were grown for 7 days at 20°C , acclimated for 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 77 and 98 days at 4°C (CA).

For photoperiod studies, Norstar winter wheat was grown for 13 days at 20°C under either a long day (20h) or a short day (8h) photoperiod, transferred at 4°C under identical photoperiods, and then sampled at regular intervals.

### Cloning of *TaVRN2* gene and promoters

The gene and promoter were amplified from cDNA libraries and genomic DNA of winter wheat (*Triticum aestivum* L., cv Norstar) using specific primers.

A cDNA library was prepared from an mRNA mixture from cold-acclimated and non acclimated crown and leaf tissues of cv Norstar. For cDNA synthesis, the SuperScript plasmid system with Gateway Technology and cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used, except that the precipitation steps without yeast carrier tRNA were replaced by the QIAquick PCR purification procedure (QIAGEN, Valencia, CA). The cDNA were directionally cloned into the pCMV.SPORT6 vector with the *SalI* adaptor (GTCTGACCCACGCGTCCG) on the 5' end and the *NotI* primer-adaptor (GCGGCCGCCCC(T<sub>15</sub>)) on the 3' end. The alignment of the three copies of *TaVrn-2* was performed by using the T-Coffee program from the web. Promoter analysis was performed by the Plant-Care program from the web. Protein sequence analyses were carried out with programs available on the ExPASy Molecular Biology Server (<http://ca.expasy.org>), T-Coffee (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>).

### **Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

Total RNA was isolated from wheat aerial part, reverse transcribed, and subjected to quantitative real-time PCR on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Relative transcript abundance was calculated and normalized with respect to 18S ribosomal RNA transcript levels. Data shown represent mean values obtained from four independent amplification reactions, and the error bars indicate the SE of the mean. Each experiment was repeated at least twice. TaqMan primers set were designed according to the specific sequence of the target gene (Invitrogen).

### **Tissue-Specificity of *TaVRN2* and abiotic stress treatments**

Winter wheat cultivar (Fredrick) was used in the tissue specific expression of *TaVRN2*. Plants were grown for 7 days at 20°C. Non-acclimated control plants (NA) were maintained at 20°C for 1 and 6 days. Cold-acclimated plants (CA) were transferred at 4°C for 1, 6 and 36 days. After CA, plants were transferred at 20°C for 1 and 5 days for deacclimation (DA). Total RNA was isolated from leaves, crown and roots, reverse-transcribed and subjected to qRT-PCR. For expression of *TaVRN-2* in response to several abiotic stresses, plants were grown for 7 days, acclimated for 1 and 6 days at 4°C (CA), or exposed to different stresses. Heat shock was performed by incubating seedlings at 40°C for 1 and 3 h. Wounding stress was induced by cutting the seedlings into 1 cm segments and placing them in water at 20°C for 3 and 14 h. Salt-stressed plants were obtained by incubating seedlings for 18 h with a nutritive solution containing 300 or 500 mM NaCl. Water stress was induced by removing seedlings from vermiculite and leaving them at 20°C without water for different periods. The relative water content was evaluated for each time point. ABA-treated plants were obtained by transferring seedlings for 18 h to a nutritive solution containing 100 mM ABA and concomitantly applying a foliar spray containing 100 mM ABA in 0.02% (v/v) Tween-20.

### **Localization of TaVRN2, TaVRT-1 and TaVRT-2 by *in situ* hybridization**

PCR amplification was performed to prepare the probes for *in situ* hybridization using specific primers (Table 2) containing the T7 (*TaVRT-1* and *TaVRT-2*) or SP6 (*TaVRN2*) RNA polymerase initiation site. The resulting fragments, containing the T7 RNA polymerase initiation site, were used as templates to synthesize anti-sense digoxigenin-labelled riboprobes using an UTP-DIG (Roche) and a T7 Maxi Script kit (Ambion). Each amplification product was tested by Southern Blot to evaluate the specificity of the probe (data not shown). Shoot apical meristem material was fixed for 8 hours at room temperature in fixation buffer (4% paraformaldehyde, phosphate buffer 0.1M; pH7) (3% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde and 0.05M NaCl in 0.05M Na-Phosphate buffer: pH 7.5), dehydrated through a graded series of ethanol and butanol dilutions, embedded in Paraplast plus (Paraplast X-Tra, Oxford Labware) and sectioned to 7  $\mu$ m with a microtome. Tissue sections were de-paraffinized with xylene, rehydrated through an ethanol series, and then pre-treated with Proteinase K (0.1U/mL) in Tris-HCl pH 7.5 at 37°C for 15 minutes. Digestion was stopped by washing with PBS+0.2 X glycine and then twice with PBS for 2 minutes each. After dehydrating in ethanol baths, hybridization was performed at 42°C (50°C) overnight with 0.2  $\mu$ g/mL of the digoxigenin-labelled RNA probe specific in hybridization solution (50% formamide, 2X SSC, 4 X Denhardt, 20% Dextran, 2 mg/mL tRNA) (50% formamide, 300mM NaCl, 1X Denhardt' solution, 0.25% SDS, 125 $\mu$ g/ml yeast tRNA and 10% dextran sulfate in TE buffer: pH 7.5). After hybridization, slides were washed in 2X SSC at 50°C for 45 min and twice in 1X NTE (Tris HCl 1mM, NaCl 0.5M, EDTA, 1mM pH 7.5) at 37°C for 2 minutes each. An RNase A digestion (20  $\mu$ g/mL in NTE) was carried out for 30 min at 37°C and stopped by washing with NTE at 37°C. Final washes were conducted in 2X SSC, 1X SSC and 0.5 X SSC for 15 min each at 50°C prior to rinsing in PBS. For signal detection, samples were incubated in blocking reagent (Roche; 10% in PBS) for 1 hour and afterwards for 30 minutes in blocking reagent containing anti-DIG alkaline phosphatase-conjugated Fab fragment antibody (Roche) diluted at 1:500.



After 3 washes for 10 min in PBS, tissues were equilibrated in detection buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) for 15 minutes prior to incubating in the same buffer supplemented with 0.2 mM NBT and 0.2 mM BCIP substrates.

### **TaVRN2 recombinant protein production**

The open reading frame (ORF) of TaVRN2\_B was amplified using the primers 5' \_ CGGATCCTATGTCCATGTCATGCGGTTTGT -3' \_ and 3' \_ AGGAATTCTTTACCGGAACCATCCGAGGTGA- 5' containing recognition sites for *Bam*HI and *Eco*R1, respectively. After PCR amplification, the *TaVRN2* cDNA was digested with *Bam*HI and *Eco*R1 and sub cloned into the *Bam*HI and *Eco*R1 site of pTrc-His\_B vector (Novagen) containing a polyhistidine tag. The TaVRN2 construct carrying by *Escherichia coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium containing 100 µg/ml ampicillin. The bacterial cells were grown to an *A*<sub>600</sub> of 0.5 at 37°C and were induced by the addition of isopropyl-thiogalactopyranoside at a final concentration of 1 mM, then harvested 3 h later. The replicates were not induced by IPTG. Each hour between one to three hours, 200µL was taken and put in micro tube for the induced and not induced cells. The cells were collected by centrifugation at 8,000 *g* for 10 min and pellets were resuspended in 200µL 1X Laemmli's sample buffer by pipette up and down. The total extracts are ready for the 1-D (dimension) SDS-PAGE. The samples were incubated at 95°C for 5 minutes. For electrophoresis, 20 µL of total proteins deposited on a 10% SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Electrophoresis was performed at 140 volts during 50 min. The transfer of proteins to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane was performed at 80 mA/membrane during 1.5 h. The membranes were blocked with 5% dry milk in TBS-T buffer (2 mM Tris-HCl, 13.7 mM NaCl, 0.1 % Tween) over night at 4<sup>0</sup>C. The membrane was washed 3 times with TBST. The membrane was incubated with Histag antibodies during 1 h (dilution 1/20 000). Membranes were washed 3 times with TBST and incubated with Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus

(PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) for 1 min and exposed to Kodak film.

### **Protein-protein interaction in yeast**

Crude yeast extracts were prepared and enzyme activities were determined as described below. Data represent an average of two experiments performed in triplicate (Kane et al., 2005).

Protein interactions were performed with the GAL4 yeast two-hybrid system (CLONTECH). The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the two-hybrid assays were AH109 (*MAT $\alpha$  trp1, leu2*), which contains *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* as well as *MEL1* reporter genes each of which uses a distinct GAL4-responsive promoter and Y187 (*MAT $\alpha$  trp1, leu2*), which contains the *lacZ* and *Mel1* reporters under the control of two distinct GAL4-responsive promoters. The vectors used for the protein-protein interaction assays were pGADT7 and pGBKT7. The oligonucleotides used to fuse the gene of interest with Gal4 AD or BD are listed in the Supplemental data section. Fusion of the test genes with the GAL4 AD or BD were done by the Gap repair technique. Fusions with pGBKT7 were introduced in Y187 and those with pGADT7 in AH109. Conjugation between haploids cells was done according to (Kaiser et al., 1994). Diploid cells were spread in triplicate on selective medium (SD/Galactose/Raffinose without adenine, leucine, tryptophan and uracil and supplemented with 10mg/L of 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-  $\alpha$ -D-galactopyranoside (x-  $\alpha$ -gal)).  $\beta$ -Galactosidase assays were carried out as previously described (Rose et al., 1990). Specific activities are measured as nanomole of ONPG [o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (Sigma)] converted per minute per milligram of protein.

### **Agroinfiltration and transactivation assay**

*Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 was transformed separately with the following binary vectors plasmids: pBin19 containing GFP as reporter gene under the control of TaVRT1 promoter (pBin19-TaVRT1:GFP) and pGreenII0029 containing TaVRT-2 or TaVRN2 as effectors genes (Transrepressors) under the control of CaMV 35S promoter (pGreenII0029-35S:TaVRT-2, pGreenII0029-35S:TaVRN2). The pBin19in containing GFP under the control of 35S was used as positive control (Voinnet et al., 2003) and an empty vector pGreenII0029-35S (without GFP) was used as negative control for background fluorescence. The vector pTZ-Luc containing luciferase gene under the control of 35S CaMV was used as the internal stranded. In order to enhance transient expression of the transgenes, agrobacteria carrying the p19 suppressor of PTGS from tomato bushy stunt virus (Win and Kamoun, 2004) was included along with the binary vectors carrying the other gene constructs. Recombinants *A. tumefaciens* was grown and prepared as described by Brande et al., 2004. Full expanded leaves from 3-4 week old *N. benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* (ecotype Colombia) plants were infiltrated with the different recombinants agrobacteria mixed in a 1:1 ratio using a 1ml disposable syringe without a needle. Infiltrated plants were incubated in a growth chamber at 24/20 °C day/night with 12/12 h light/dark. GFP expression was observed at 5-7 days post infiltration under a confocal fluorescent microscopy. The experiments were replicated 3 times under the same conditions.

### **Overexpression of TaVRN2 in Arabidopsis thaliana**

For *Arabidopsis* transformation, *A. tumefaciens* carrying the binary vector pGreenII0029/35S-TaVRN2 was used to transform *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) using the floral dip method as described by (Clough and Bent, 1998). T<sub>1</sub> seeds were selected on 0.5x MS salts and 1x MS vitamins (Murashige and Skoog, 1962) containing 50 µg mL<sup>-1</sup> kanamycin. Transgenic T<sub>1</sub> seedlings were transferred to

soil and kept at 24/20 °C day / night in a growth chamber with 12/12 h light/dark to produce T1 and T3 lines.

### **RT-PCR-gel analysis**

The level of the transgene expression in R1 plants was determined by RT-PCR analysis using *TaVRN2* cDNA as probe. Total RNA from aerial part of transgenic and wild type *Arabidopsis* plants was isolated using a Trisol Kit (Life Technologies, U.S.A.) according to the manufacture recommendations. Two µg of RNA were reverse transcribed, and subjected to RT-PCR using random primers (Invitrogen) accordingly to manufacturer recommendations. The cDNA was diluted into 200 µL with RNase Free Water, and 2 µL aliquots were analyzed by using Specific primers of *TaVRN2* in 50 µL PCR reaction volume for gene expression, 10 µL from the PCR amplification products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose/ethidium bromide gels.

## REFERENCES

Becker A, Theissen G (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 : 464-489

Blazquez MA (2000) Flower development pathways. *Journal of Cell Science* 113: 3547-3548

Brande B.H. Wulff, Marco Kruijt, Peter L. Collins, Colwyn M. Thomas Andrea A. Ludwig, Pierre J.G.M. De Wit and Jonathan D.G. Jones (2004). Gene shuffling-generated and natural variants of the tomato resistance gene *Cf-9* exhibit different auto-necrosis-inducing activities in *Nicotiana* species *Plant J.* 40 : 942

Clough S and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-43.

Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F. (2003). TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiol.* 132 :1849-60.

Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D, Valarik M, Sanchez A, Yan L (2006). Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. *Plant Mol Biol.* :469-480.

Kaiser C, Michaelis M and Mitchel A (1994) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kane, N.A., Danyluk, J., Tardif, G., Ouellet, F., Laliberté, J.F., Limin, A.E., Fowler, D.B. and Sarhan, F. 2005. TaVRT-2, a member of the StMADS-11 clade of flowering repressors, is regulated by vernalization and photoperiod in wheat. *Plant Physiol* 138: 2354-2363

Martínez, C., Pons, E., Prats, G. and Leon, J. (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.* 37: 209-217.

Murashige, T. , Skoog F. (1962) Plant salts. HS-No. 3821000 *Physiol. Plant.* 15: 473-97

Ogawara, T., Higashi, K., Kamada, H. and Ezura, H. (2003) Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 160: 1335–1340.

Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T. and Nakamura, K. (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 252–261.

Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. and Coupland, G. (2000) Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613–1616.

Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116–1120.

Trevaskis Ben, Megan N Hemming, W James Peacock, Elizabeth S Dennis. (2006). HvVRN2 responds to day-length whereas HvVRN1 is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol Preview* DOI:10.1104/pp.105.073486.

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. and Coupland, G. (2004) Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science* 303: 1003–1006.

Veronese, P., Narasimhan, M.L., Stevenson, R.A., Zhu, J.K., Weller, S.C., Subbarao, K.V. and Bressan, R.A. (2003) Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 35: 574–587.

Weigel, D. (1995). The genetics of flower development: From floral induction to ovule morphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 29: 19-39.

Win J, Kamoun S (2004) pCB301-p19: a binary plasmid vector to enhance transient expression of transgenes by agroinfiltration.

Winston F., Hieter P., (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course*. Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press

Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6263-6268

Yan LL, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J (2004) The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303: 1640-1644

Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308–312.

## LEGEND OF FIGURES AND TABLES

**Figure 1.** Structure of *TaVRN2* from *Triticum. aestivum* cv Norstar. A) Gene structure. B) zinc finger domain of TaVRN2 proteins encoded by the three copies of genome A, B and D. Alignment was done using T-Coffee program from the web. C) Putative regulatory cis-elements in the promoter of *TaVRN2* identifying the plant care software. These putative regulatory elements are involved in several abiotics stresses (MBS: MYB binding site involved in drought-inducibility, ABRE: cis-acting element involved in abscisic acid responsiveness, HSE: cis-acting element involved in heat stress responsiveness, ACE: cis-acting element involved in light responsiveness, DRE: cis-acting element involved in cold stress and TATA-box).

**Figure 2.** *TaVRN2* expression pattern during cold acclimation. Plants were grown for 7 days at 20°C , acclimated for 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 77 and 98 days at 4°C (CA). Total RNA was isolated from wheat aerial part, reverse-transcribed and subjected to qRT-PCR. Panel A represents the expression profile of TaVRN2\_A and TaVRN2\_B copies from winter wheat (cv Norstar) and spring wheat (cv Manitou). Panel B describes the TaVRN2\_D copy from the two cultivars.

**Figure 3.** TaVRN2 A and B copies expression profile under short day and long day experiment from winter wheat (cv Norstar). Plants were grown for 13 days at 20°C under either a long day (20h) or a short day (8h) photoperiod, transferred at 4°C under identical photoperiods, and then sampled at regular intervals. Total RNA was isolated from wheat aerial part, reverse-transcribed and subjected to qRT-PCR.



**Figure 4** Expression analysis in different tissues and in response to several abiotic stresses. Panel A, *TaVRN-2* expression pattern in different tissues. Winter wheat cv Fredrick were grown for 7 days at 20°C. Non-acclimated control plants (NA) were maintained at 20°C for 1 and 6 days. Cold-acclimated plants (CA) were transferred at 4°C for 1, 6 and 36 days. After CA, plants were transferred at 20°C for 1 and 5 days for deacclimation (DA). Total RNA was isolated from leaves, crown and roots, reverse-transcribed and subjected to qRT-PCR. Panel B, *TaVRN-2* expression analysis in response to several abiotics stresses. Winter wheat cv Fredrick were grown for 7days, acclimated for 1 and 6 days at 4°C (CA), or exposed to different stresses, heat shock(HS) plants exposed to 40°C for 1 h and 3 h; wounding (W) stress for 3 h and 14 h; sodium chloride (NaCl), plants treated with 300 and 500 mM for 18 h; water stress plants with a relative water content (RWC) in a proportion of 100, 84, 76, 57 and 44%; abscisic acid (ABA), plants treated with 0.1 mM ABA for 18 h (Fig.4.B).

Data shown represent mean values obtained from four independent amplification reactions ( $n = 4$ ), and the error bars indicate the range of possible RQ values define by the SE of the delta threshold cycles (Cts). This experiment was repeated three times with similar results.

**Figure 5** Temporal and spatial localization of *TaVRT-1*, *TaVRT-2* and *TaVRN2* transcript in shoots primordia of winter wheat cultivars *Triticum aestivum* L (cv Norstar) during cold acclimation. The amplification product was obtained with the 5' primer and the 3' primer, containing the T7 (*TaVRT-1* and *TaVRT-2*) or SP6 (*TaVRN2*) polymerase site.

**Figure 6** Recombinant *TaVRN2\_B* protein production. SDS–PAGE analysis of bacterial extracts. *E. coli* harbouring the recombinant His-tagged protein was induced by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The replicates were not induced by IPTG. Panel A; protein pattern stained with Coomassie brilliant blue R-250. Lane 1,

molecular marker (kDa), lane 2 the empty vector pTrcHis\_B as a negative control. Lane 3, the replicate of lane 4 after one hour induction by IPTG. Lane 5, the replicate of lane 6 after two hours of induction. Lane 7 the replicate of lane 8 after three hours of induction. Panel B the Western blot obtained with the anti-His antibody. Lane 1, the replicate of lane 2 after one hour induction and lane 3, the replicate of lane 4 after three hours of induction.

**Figure 7** Tandem Mass spectrophotometry (MS/MS) analysis of TaVRN2 after digestion with trypsin. Panel A shows the PBMS (Probability Based Mouse Score) of results obtained (m/z) according to the number of hits. Panel B explains the PBMS. Panel C shows the chromatogram after trypsin digestion. Panel D shows the peptides matched with the green color. Panel E gives the significant hits after blasting the peptides obtained against public data bases (NCBI) by using the MASCOT program and "viridiplantae" a taxonomic filter for green plants.

**Figure 8** Transrepression of the TaVRT-1 promoter activity using agrobacterium-transient expression assay in tobacco plants. Panel A, Lazer-scanning confocal microscopy showing GFP expression in leaf epidermal cells from plants infiltrated or co-infiltrated with different constructs (TaVRT-1 promoter activity with GFP as a reporter gene (1\_A), TaVRT-1 promoter with GFP + VRN2 (2\_A), TaVRT-1 promoter with GFP + TaVRT-2 (3\_A) and TaVRT-1 promoter with GFP + TaVRT-2 + Vrn2 (4\_A). Panel B, Immunoblot detection of GFP protein in agroinfiltrated leaves. The numbers in panel B correspond to the numbers in panel A. In panel B experiments 2, and 4 were done in duplicate and experiment 3 in triplicates.

**Figure 9** *Arabidopsis* transgenic plants expressing TaVRN2 gene (A) 10 days, (B) 19 days after transferring T1 (first generation) seedlings into soil.

**Figure 10** The level of the transgene expression in R1 (FIRST GENERATION) plants were determined by RT-PCR analysis using *TaVRN2* cDNA as probe. Total RNA from aerial part of transgenic and wild type *Arabidopsis* plants was isolated using a Trisol Kit (Life Technologies, U.S.A.) according to the manufactures recommendations. RNA (2  $\mu$ g) were reverse transcribed, and subjected to RT-PCR using random primers (Invitrogen) accordingly to manufacturer recommendations. The cDNA was diluted into 200  $\mu$ L with RNase Free Water, and 2  $\mu$ L aliquots were analyzed by using Specific primers of *TaVRN2* in 50 $\mu$ L PCR reaction volume for gene expression, 10  $\mu$ L form the PCR amplification products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose/ethidium bromide gels.

## FIGURES AND TABLES

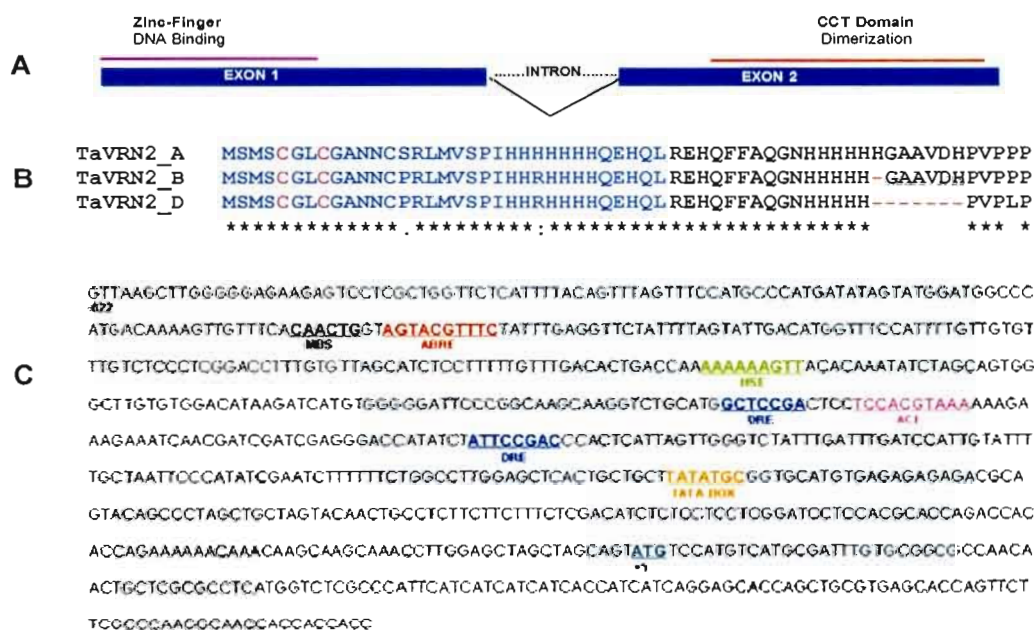


Figure 1

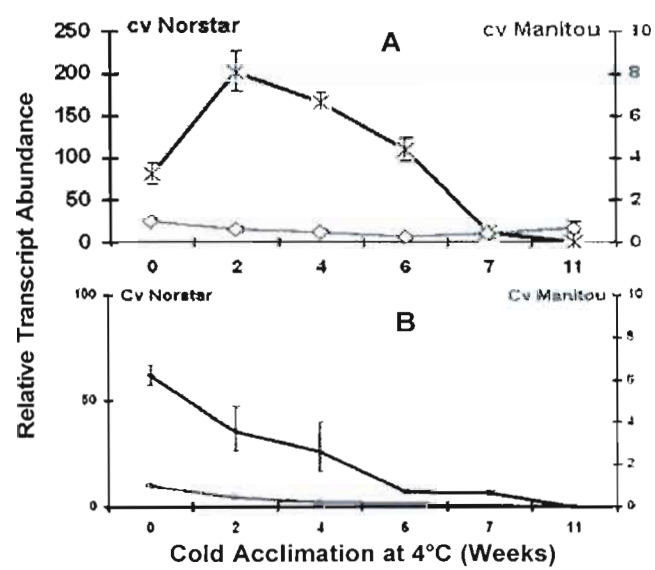


Figure 2

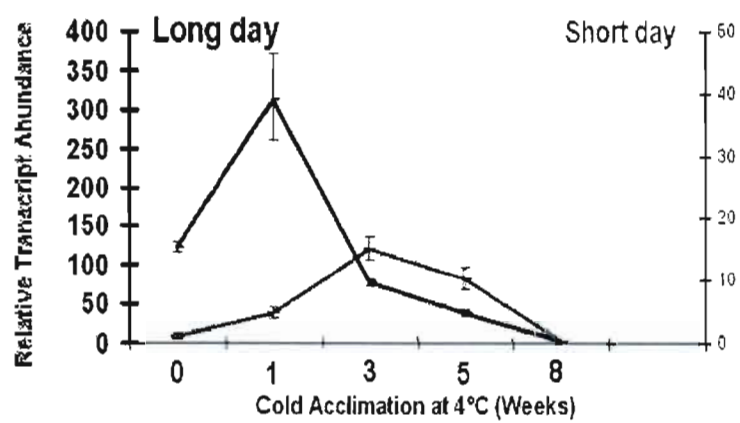


Figure 3

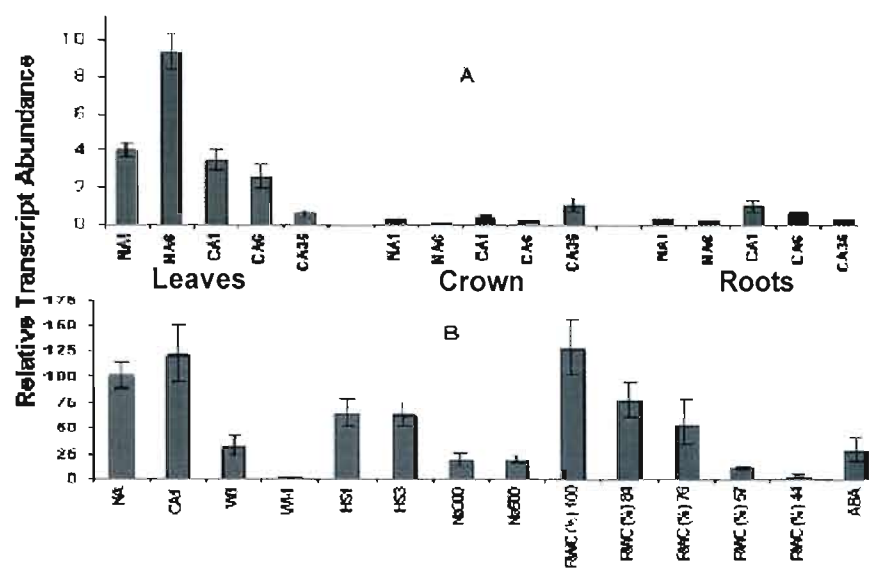


Figure 4

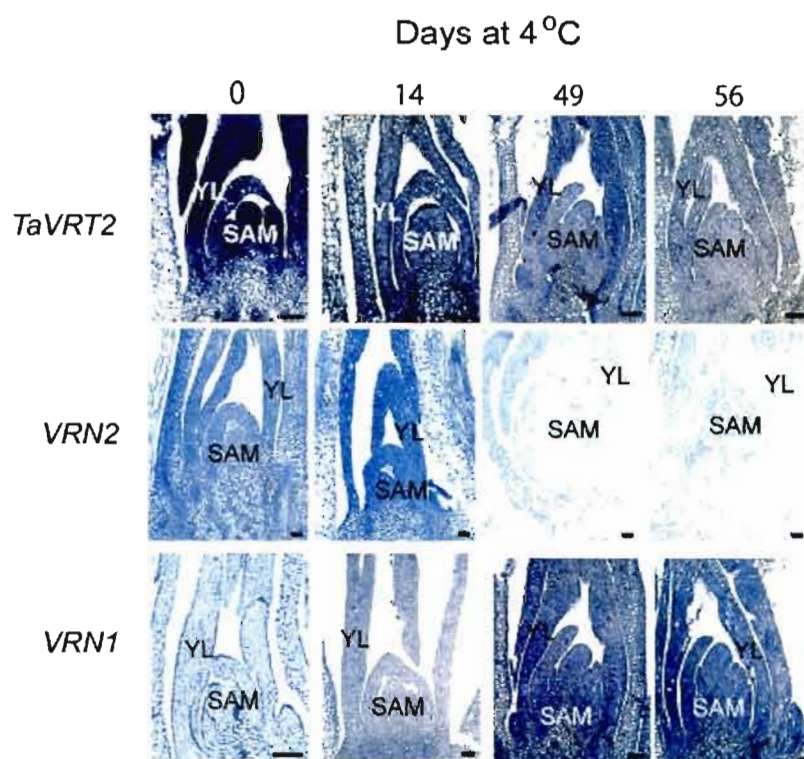


Figure 5



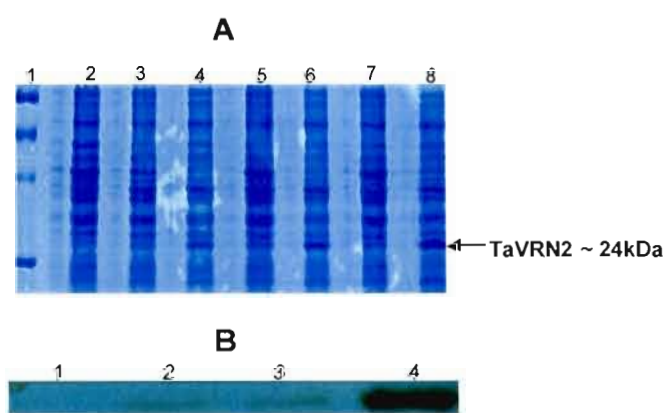
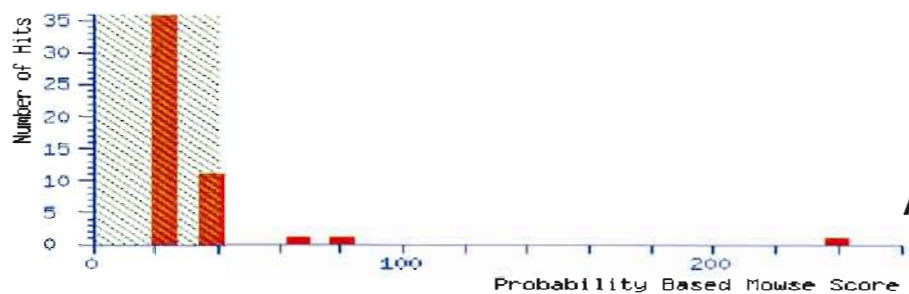


Figure 6



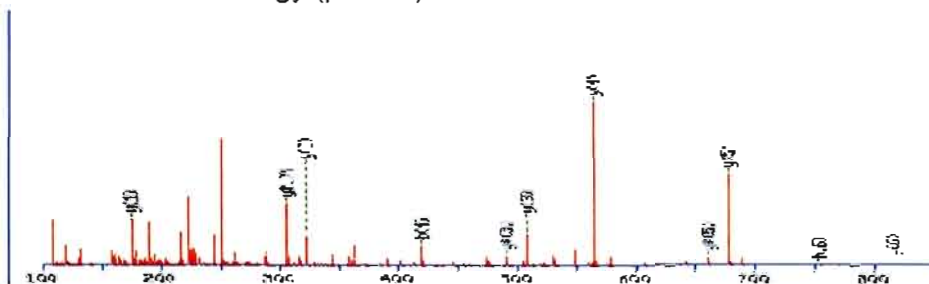
A

### Probability Based Mowse Score

Score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores  $> 40$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).

B

C



D

Matched peptides shown in gree

```

1  MSMSGGLCGA  NNCPRLMVSP  IHHRHHHHQE  HQLRQHQQFA  QGNHHHHHPV
51  PLPPANFDHS  RTWITPFHET  AAAGNSSPLT  LEVGAGGRPM  AHLVQPPARA
101  HIVPFYGGAF  TNTISNEAIM  TIDTEMMVGP  AHYPTMQERA  AKVMRYREKR
151  KRRRYDKQIR  YESRKAYAE  RPRVNGCFVK  VPEAMASPSS  PASPYDPSKL
201  HLGWFR

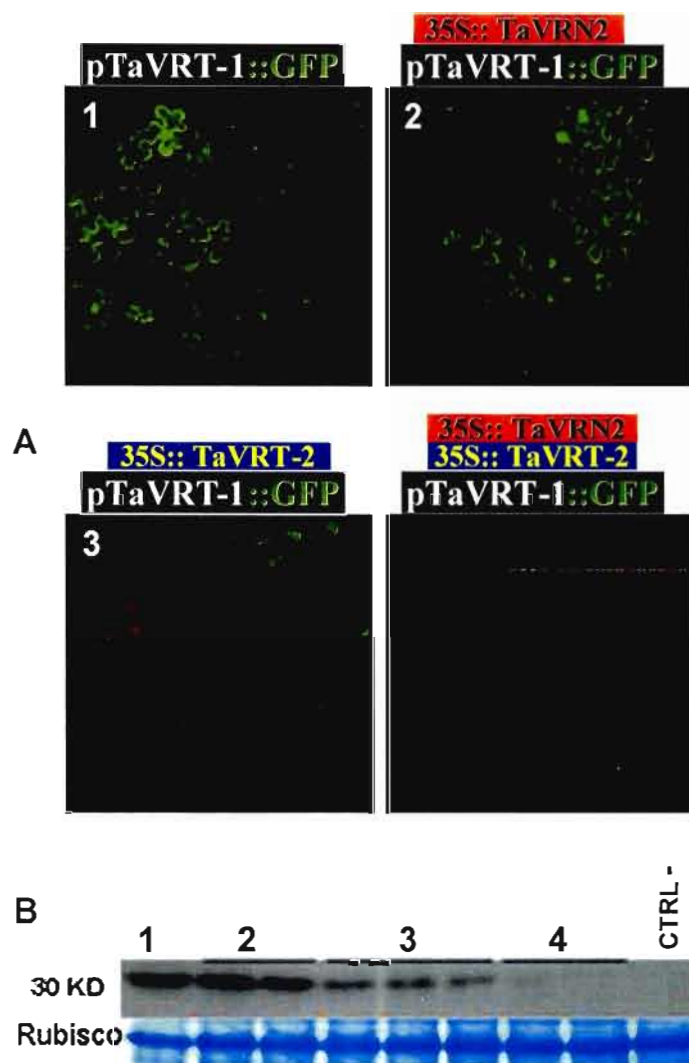
```

### Significant hits:

|   | Accession                   | Mass  | Score | Description   |
|---|-----------------------------|-------|-------|---|
| • | <a href="#">gi 45390745</a> | 23704 | 239   | ZCCT1-Td [Triticum turgidum]                        |
| • | <a href="#">gi 45390706</a> | 24586 | 136   | ZCCT1 [Triticum monococcum]                         |
| • | <a href="#">gi 47846294</a> | 31522 | 82    | hypothetical protein [Hord. vulgare subsp. vulgare] |
| • | <a href="#">gi 45390701</a> | 24560 | 60    | ZCCT1 [Triticum monococcum]                         |
| • | <a href="#">gi 45390696</a> | 24559 | 60    | ZCCT1 [Triticum monococcum]                         |
| • | <a href="#">gi 45357053</a> | 24590 | 60    | ZCCT1 [Triticum monococcum]                         |
| • | <a href="#">gi 45390681</a> | 24397 | 60    | ZCCT1 [Triticum monococcum]                         |

E

Figure 7



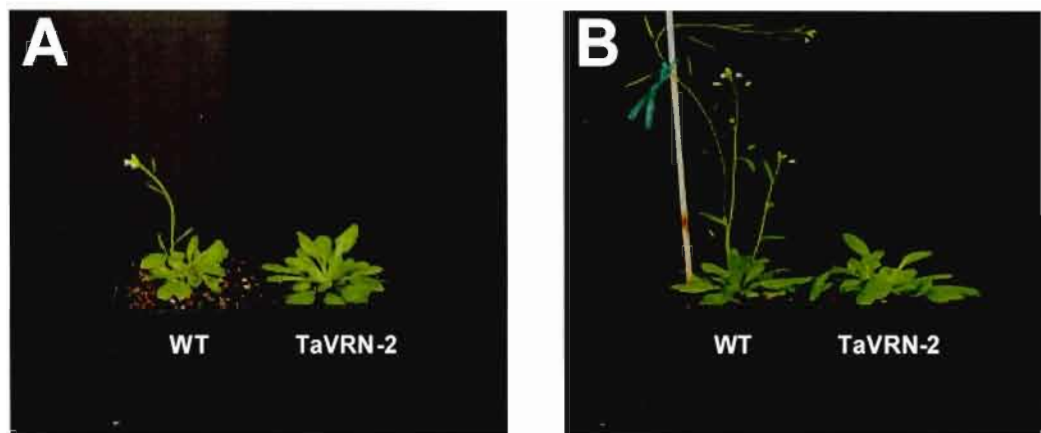


Figure 9

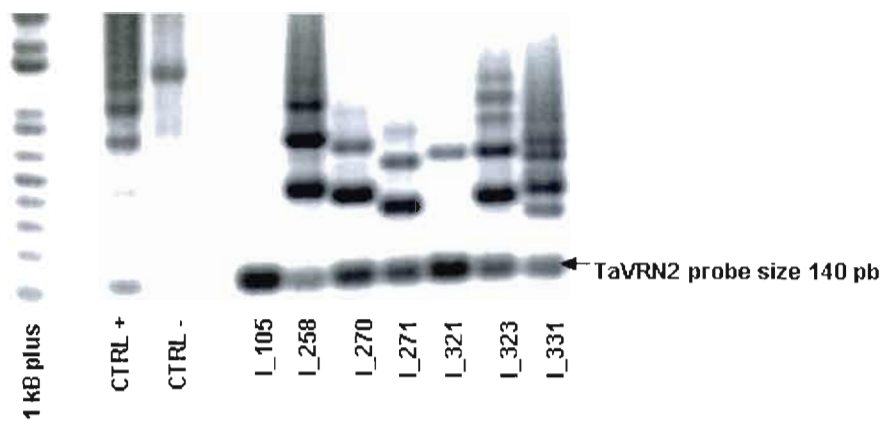


Figure 10

**Table 1:** Protein-protein interactions in yeast

| GAL4 Binding (BD) and Activating (AD) domains | $\beta$ -Galactosidase activity (nmol/min/mg of protein) |           |
|---|--|-----------|
| AD-VRN-2 + pBDT7 (control)                    | 2.0  | $\pm 0.3$ |
| BD-VRN-2 + pGADT7 (control)                   | 7.4  | $\pm 0.7$ |
| AD-VRN-2 + BD-VRN-2                           | 12.4   | $\pm 0.3$ |
| AD-VRN-2 + BD- <i>Ta</i> VRT-2                | 98   | $\pm 3$   |
| AD-VRN-2 + BD- <i>Ta</i> VRT-1                | 50   | $\pm 4$   |
| AD- <i>Ta</i> HD1 + BD- <i>Ta</i> VRT-2       | 33   | $\pm 3$   |
| AD- <i>Ta</i> HD1 + BD- <i>Ta</i> VRT-1       | 20   | $\pm 4$   |

**Table 2:** Primers used for different experiments

| Studies   | Primers  |
|---|--|
| Gene copies amplification from genomic DNA (gDNA) and cDNA library<br><br>Internals primers for introns amplification | ATGTCCATGTCATGCGGTTTGT, FW<br>TTACCGGAACCATCCGAGGTGAA, RV<br><br>FTCCTGAAAAAGATATGCGGGAATGGA, FW_NOR<br>TGCCAGAGGAGTTGTTAGCTTCCACTGT, RV_NOR<br><br>TCCTGAAAAAGATATGCGGGAATGGA, FW_MAN<br>CATGTTACCCCAAACGGACTCAGAT, RV_MAN                        |
| Expression analysis by qRT-PCR  | CCGACACATGGCTCACCTAGTG, FW_Copies A and B<br>TTGCTTCATTGCTAATAGTGTTTGT, RW_Copies A and B<br><br>GGCAAGAGCCCACATCGTGCCATTT, TaqMan Probe<br><br>CGACCATGGCTCACCTAGTG, FW_Copy D<br>TTGCTTCATTGCTAATAGTGTTTGT, RW_Copy D                            |
| Promoters amplification from gDNA   | GTTAAGCTTGGGGGAGAAGAGTCC, FW<br>GGTGGTGGTGGTTGCCTTG, RV  |
| <i>In situ</i> localisation   | CGTGAGCACCAGTTCTTCGCCC, FW_TaVRN2<br>GTGAGCCATGTGTCGGCCGCC, RV_TaVRN2<br><br>GCTGAAGGGCTTCCAGCCCATATAAG, FW_TaVRT1<br>TACATGGTAAATTGAGCCCAGCTGGG, RV_TaVRT1<br><br>GTGGCCGTTGCCGAAGCTGAAAAT, FW_TaVRT2<br>CGCGCCATGCAAATGGAGACATAAAACGA, RV_TaVRT2 |
| RT-PCR study  | GGCGGCCGACACATGGCTCA, FW<br>TGGGCAGGCCCCACCATCATC, RV  |
| Recombinant protein production  | CGGATCCTATGTCCATGTCATGCGGTTTGT, FW<br>AGGAATTCTTTACCGGAACCATCCGAGGTGA, RV  |

## CONCLUSION

Ce projet présente l'isolation et la caractérisation moléculaire chez le blé hexaploïde (*Triticum aestivum*) du gène de vernalisation 2 (*VRN2*) nommé *TaVRN2*. Ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription doigt de zinc. La caractérisation de *VRN2* chez le blé diploïde suggère qu'il est répresseur de floraison durant la vernalisation. À l'heure actuelle aucun homologue de *VRN2* n'est connu chez *Arabidopsis thaliana*.

L'accumulation de *TaVRN2* chez le génotype Norstar et Manitou acclimatés au froid est fortement associée avec la capacité de ces espèces végétales à contrôler la floraison durant la vernalisation. L'accumulation de son transcrit chez le blé est réprimée avec la réponse à la vernalisation et à la capacité du méristème de passer d'une phase végétative à une phase reproductive. Dès lors, *TaVRN2* pourrait être utilisé comme marqueur moléculaire pour distinguer les espèces végétales nécessitant une période de vernalisation pour entrer en phase de reproduction de celles pouvant fleurir sans un traitement au froid. Des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine recombinante *TaVRN2* sont en cours de production et pourront aussi être utilisés comme marqueurs. Une analyse d'immunobuvardage permettrait la détection de la protéine *TaVRN2* au niveau des tissus de blé. Ces résultats permettront de corréler l'expression protéique de *TaVRN2* avec celle de son ARNm, ce qui aurait permis de voir si la régulation du gène *TaVRN2* se faisait essentiellement au niveau transcriptionnelle. Des expériences d'agroinfiltration du promoteur de *TaVRN2* fusionné avec GFP en utilisant certains gènes reconnus importants lors du contrôle de la floraison (*TaVRT-1*, *TaVRT-2*, *TaFT*, *TaCO* etc.) ou leurs produits comme gènes



rapporteurs. De plus, des études sur le promoteur sont en cours. Pour toutes ces expériences, les anticorps polyclonaux en cours de production joueront un rôle majeur.

Des études de cartographie chromosomique chez le blé diploïde utilisant des lignées de délétion ont permis de positionner *ZCCT1/VRN2* dans la région *VRN2* sur le chromosome 5A (Yan et al., 2004). Cette région est reconnue pour être riche en gènes régulateurs du processus de vernalisation et du contrôle de la floraison. Des études d'expression durant des périodes de jours longs ou de jours courts montrent que l'accumulation des transcrits du gène *TaVRN2* est en plus influencée par la photopériode. Des études ont montré que la photopériode influence l'expression du gène *ZCCT1* chez le blé diploïde (Dubcovsky et al., 2006), de même que chez l'orge les gènes *HvZCCT1* et *HvZCCT2* (Trevaskis et al., 2006). Ceci serait relié par la localisation de ces gènes dans la région chromosomique de *VRN2*. Ceci suggère que l'expression de gènes localisés dans cette région chromosomique chez les céréales serait influencée par la photopériode, le développement et la transition florale. Ces résultats ont permis d'associer un gène à l'interaction reconnue entre l'acclimatation au froid, la photopériode et la répression de la transition florale par la vernalisation. Les études préliminaires de surexpression de *TaVRN2* chez *A. thaliana* révèlent un retard de floraison de près de deux semaines chez les plants transgéniques même si aucun homologue de *TaVRN2* n'est caractérisé chez *A. thaliana*. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle le gène *VRN2* réprime la floraison.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail, surtout l'emphasis mise sur la relation entre le gène *TaVRN2* et les deux autres gènes importants impliqués dans ce projet, *TaVRT-1* et *TaVRT-2* qui appartiennent à la famille de facteurs de transcription MADS-box. Et le fait que cette famille de facteurs de transcription joue un rôle crucial à l'identité et la maturation des organes floraux en d'autres mots au bon processus de floraison, il devient essentiel de mieux caractériser cette famille de facteurs de transcription MADS-box chez les céréales. Avec différents projets de séquençage de génome de plantes et de génération de banques d'ESTs (*Expressed Sequences Tags*), de nombreux membres de cette famille ont été identifiés et clonés par notre groupe chez le blé hexaploïde (*Triticum aestivum* acclimaté au froid). La suite logique de ce projet consiste à choisir certains gènes parmi ceux isolés en fonction de leur profil d'expression durant l'acclimatation au froid, la vernalisation et la photopériode et en relation avec le contrôle de la floraison. Plus tard, une étude comparative pourra être également dressée pour mieux comprendre l'évolution des familles de gènes et leurs fonctions chez les eucaryotes.

Les facteurs MADS-box sont connus pour former les homo et hétérodimères. Des études de criblage à l'aide du système double hybride sont en cours, ceci dans le but d'identifier de possibles partenaires de régulation du gène *TaVRT-1* et *TaVRT-2*. Les résultats d'une telle étude permettront de constituer une carte sommaire des interactions protéine-protéine impliquées dans ces processus d'adaptation (induction de la floraison par la vernalisation et la photopériode, acclimatation au froid et développement de la tolérance au gel).

Lorsqu'on s'attarde sur le modèle dit ABCDE (pour les fonctions respectives de *AP1*, *AP3/PI* et *AG*), établi chez les dicotylédones, on remarque par exemple que les facteurs MADS-box de la branche API/SQUA semblent avoir gardé leur structure génétique et possiblement leur fonction chez les angiospermes. Les gènes de la classe B chez les monocotylédones ont une fonction similaire chez les dicotylédones. On remarque aussi chez les céréales, plus particulièrement chez le génome de riz séquencé, que le nombre de facteurs responsables de l'identité des organes floraux, de la réponse au stress serait encore plus limité comparativement aux dicotylédones; d'ailleurs plusieurs de ces facteurs MADS-box (*FLC*, *AGL20*) sont identifiés chez le génome d'*Arabidopsis* et seraient absents chez celui du riz (Goff et al., 2002).

L'identification des déterminants génétiques et la connaissance de leurs interactions avec l'environnement pourront être utilisés à des fins pratiques en terme de développement et de sélection de variétés végétales, par exemple : augmenter la productivité et la qualité des graines d'espèces à intérêt agroalimentaire ; avancer ou retarder le temps de floraison et du mûrissement des fruits; produire des plantes avec plus de feuilles pour augmenter la photosynthèse ou encore plus de racines pour combattre les effets d'une sécheresse; pouvoir faire des semences plus d'une fois durant l'année.

## REFERENCES

- Allard, F., Houde, M., Kröl, M., Ivanov, A., Huner, N.P.A., and Sarhan, F. (1998). Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* 39 : 1194–202.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F., and Yanofsky, M.F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24 : 457-66.
- Ammerer, G. (1990). Identification, purification, and cloning of a polypeptide (PRTF/GRM) that binds to mating-specific promoter elements in yeast. *Genes Dev.* 4 : 299-312.
- Andersen C.H., Jensen C.S. and Petersen K. (2004), Similar genetic switch systems might integrate the floral inductive pathways in dicots and monocots. *Trends Plant Sci.* 9:105-107
- Becker A, Theissen G (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 : 464-489
- Blazquez MA (2000) Flower development pathways. *Journal of Cell Science* 113: 3547-3548
- Bohnert, H.J., and Shen, B. (1999). Transformation and compatible solutes. *Sc Hort* 78 : 237–60.
- Brande B.H. Wulff, Marco Kruijt, Peter L. Collins, Colwyn M. Thomas Andrea A. Ludwig, Pierre J.G.M. De Wit and Jonathan D.G. Jones (2004). Gene shuffling-generated and natural variants of the tomato resistance gene *Cf-9* exhibit different auto-necrosis-inducing activities in *Nicotiana* species *Plant J.* 40 : 942
- Breton, G., Danyluk, J., Ouellet, F., and Sarhan, F. (2000). Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6 : 59-101.
- Chouard, P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11 :191–237.
- Clough S and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-43.

Cook T, Urrutia R. (2000). TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* ;278(4):G513-21.

Dallaire, S., Houde, M., Gagné, Y., Saini, H.S., Boileau, S., Chevrier, N., and Sarhan, F. (1994). ABA and low temperature induce freezing tolerance via distinct regulatory pathways in wheat. *Plant Cell Physiol.* 35 :1-9.

Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F. (2003). TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiol.* 132 :1849-60.

De Bodt S, Raes J, Van de Peer Y, Theissen G. (2003a) And then there were many: MADS goes genomic. *Trends Plant Sci.* 10 : 475-83

Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D, Valarik M, Sanchez A, Yan L. (2006). Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. *Plant Mol Biol.* :469-80.

Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L., and Tranquilli, G. (1998). Comparative RFLP Mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor. Appl. Genet.* 97: 968-75.

Fowler, D.B., Limin, A.E., Wang, S-Y., and Ward, R.W. (1996b). Relationship between low-tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Theor. Appl. Gen.* 93-99

Galiba, G., Quarrie, S.A., Sutka, J., and Morgounov, A. (1995). RFLP Mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90: 1174-79.

Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A., and Briggs, S. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296: 92-100.

- Guy, C.L. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 187-223.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J (1999) Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50: 413-434
- Johansen, B., Pedersen, L.B., Skipper, M., and Frederiksen, S. (2002). MADS-box gene evolution-structure and transcription patterns. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 458-480.
- Kaiser C, Michaelis M and Mitchel A (1994) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kane, N.A., Danyluk, J., Tardif, G., Ouellet, F., Laliberté, J.F., Limin, A.E., Fowler, D.B. and Sarhan, F. 2005. TaVRT-2, a member of the StMADS-11 clade of flowering repressors, is regulated by vernalization and photoperiod in wheat. *Plant Physiol* 138: 2354-2363
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. and Weigel, D. (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286: 1962–1965.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960–1962.
- Koornneef, M., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C., Soppe, W., and Peeters, T. (1994). The phenotype of some late-flowering mutants is enhanced by a locus on chromosome 5 that is not effective in the Landsberg erecta wild-type. *Plant J.*, 911-919.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. and van der Veen, J.J. (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol.Gen. Genet.* 229: 57–66.
- Kozaki A, Hake S, Colasanti J (2004) The maize ID1 flowering time regulator is a zinc finger protein with novel DNA binding properties. *Nucleic Acids Research* 32: 1710-1720
- Kumar, A., Minocha, S.C. Transgenic manipulation of polyamine metabolism. (1998). In Lindsey K (ed) *Transgenic Plant Res.* Amsterdam Harwood: 187–199.
- Lang, A., Melchers, G. (1947). « Vernalisation und Devernalisation bei einer zweijährigen Pflanze », *Z. Naturforsch* 2b: 444-449

- Lång, V. Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B., and Palva, E.T. (1994). Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 104: 1341-49.
- Lloyd, A.W., Ollif, C.J., and Rutt, K.J. (1994). A study of modified betaines as cryoprotective additives. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 704-707.
- Lynch, D.V., and Steponkus P.L. (1987). Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol.* 183: 761-67.
- Martínez, C., Pons, E., Prats, G. and Leon, J. (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.* 37: 209-217.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L., and Hanson, A.D. (1999). Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* 120: 945-949.
- Michaels SD, Amasino RM (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11: 949-956
- Michaels SD, Amasino RM (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* 13: 935-941
- Murashige, T. , Skoog F. (1962) Plant salts. HS-No. 3821000 *Physiol. Plant.* 15: 473-97
- Napp-Zinn, K. (1987). Vernalization. Environmental and genetic regulation. Manipulation of flowering. Éd. J.G. Atherton, Butterworth, London:123-132
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., and Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55: 989-1003.
- Ogawara, T., Higashi, K., Kamada, H. and Ezura, H. (2003) Ethylene advances the transition from vegetative growth to flowering in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 160: 1335-1340.

Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T. and Nakamura, K. (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 252–261.

Szucs P, Karsai I, von Zitzewitz J, Meszaros K, Cooper LLD, Gu YQ, Chen THH, Hayes PM, Skinner JS (2006) Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1277-1285

Pearce RS. (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* 29: 47-76

Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD, (2006). The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor, *Nature* 439:290-294.

Richard Amasino, (2004). Vernalization, Competence, and the Epigenetic Memory of Winter. *Plant Cell* 16:2553-2559

Roberts, D.W.A. (1990). Identification of loci on chromosome 5A of wheat involved in control of cold hardiness, vernalization, leaf length, rosette growth habit, and height of hardened plants. *Genome* 33, 247-59.

Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. and Coupland, G. (2000) Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613–1616.

Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C* (FLC). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97: 3753–3758.

Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229: 1-13.

Sibum Sung and Richard M. Amasino (2005). REMEMBERING WINTER: Toward a Molecular Understanding of Vernalization. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 491-508

Sommer, H., Beltran, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lonnig, W.E., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z. (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9: 605-613.



Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116–1120.

Thomashow MF. (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.* 125 :89-93

Thomashow MF (1999), PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50:571-599.

Thomashow, M.F. (1991). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1-8.

Trevaskis Ben, Megan N Hemming, W James Peacock, Elizabeth S Dennis. (2006). HvVRN2 responds to day-length whereas HvVRN1 is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol Preview* DOI:10.1104/pp.105.073486.

Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA (2005) The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031-1034

Uemura, M., Joseph, R.A., and Steponkus, P.L. (1995). Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.* 109: 15–30.

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. and Coupland, G. (2004) Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science* 303: 1003–1006.

Veronese, P., Narasimhan, M.L., Stevenson, R.A., Zhu, J.K., Weller, S.C., Subbarao, K.V. and Bressan, R.A. (2003) Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 35: 574–587.

Weigel, D. (1995). The genetics of flower development: From floral induction to ovule morphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 29: 19-39.

Williams, R.J. (1992). Anomalous behaviour of ice in solutions of ice-binding arabinoxylans. *Thermochim. Acta* 212: 105-110

Win J, Kamoun S (2004) pCB301-p19: a binary plasmid vector to enhance transient expression of transgenes by agroinfiltration.

Winston F., Hieter P., (1990) Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course. Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press

Xin, Z., and Browse, J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.* 23:893-902.

Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6263-6268

Yan LL, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen JL, Echenique V, Dubcovsky J (2004) The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303: 1640-1644

Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L, Drews, G.N., Feldmann, K.A., and Meyerowitz, E.M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-39.

Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 308–312.

Yoshida, M., Abe, J., Moriyama, M., and Kuwabara, T. (1998). Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol. Plant.* 103: 8–16.

Zhu, J-K. (2001). Cell signalling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 401-6.

## ANNEXE

### ANALYSE DE TaVRN2

>TaVRN2\_A\_Open Reading Frame (ORF) 642pb amplified from the winter wheat cold acclimated (cv Norstar) cDNA library

**ATG**TCCATGTCATGCGGTTTGTGCGGCGCAACAACCTGCTCGCGCCTCATGGTCTCGCCATTTCATCATCATCACCATCATCA  
GGAGCACCAGCTGCGTGAGCACCAGTTCTTCGCCCAAGGCAACCACCACCACCACCATTGGCGCGGCAGTAGACCACCCAGTGC  
CACC GCCGCCAGCCAACTTCGACCACCGCAGAACATGGACTACACCATTTTCATGAAACAGCAGCTGCAGGGAACAGCAGCAGGCTC  
ACACTGGAGGTGGGCGCAGGCGGCCGACACATGGCTCACCTAGTGCAGCCACC **GGCAAGAGCCACAT** **TGCCATT**TATGGAGG  
TGCATTACAAACACTATTAGCAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGTGGGGCCTGCCATTATCCCAATGC  
AGGAGAGAGCAGCGAAGGTGATGAGGTATAGGAGAAGAGGAAGAGGCGCGCTATGACAAGCAAATCCGATACGAGTCCAGAAAA  
GCTTACGCTGAGCTCCGGCCACGGGTAAACGGCCGCTTCGTCAAGGTACCCGAAGCCATGGCGTCGCCATCATCTCCAGCTTTGCC  
CTATGGTCTAGTAAACTTCACCTCGGATGGTCCGG**TAA**

>TaVRN2\_A\_ORF\_213 aa

MSMSCGLCGANNC SRLMVSP IHHHHHHH QEHLREHQFFAQGNHHHHHGA AVDHPVPPPPANFDHRR  
TWTFPHETAAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTISNEAIMTIDEMMVG  
PAHYPTMQERA AKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGP  
SKLHLGWFR

>TaVRN2\_B\_ORF\_639pb amplified from the winter wheat cold acclimated (cv Norstar) cDNA library

**ATG**TCCATGTCATGCGGTTTGTGCGGCGCTAACAACCTGCCGCGCCTCATGGTCTCGCCATTTCATCATCGTCATCACCATCATCA  
GGAGCACCAGCTGCGTGAGCACCAGTTCTTCGCCCAAGGCAACCACCACCACCACCATTGGCGCGGCAGTAGACCACCCAGTGCCAC  
CGCCGCCAGCCAACTTCGACCACCGCAGAACATGGACTACACCATTTTCATGAAACAGCAGCTGCAGGGAACAGCAGCAGGCTCACA  
CTGGAGGTGGGCGCAGGCGGCCGACACATGGCTCACCTAGTGCAGCCACC **GGCAAGAGCCACAT** **TGCCATT**TATGGAGGTGC  
ATTACAAACACTATTAGCAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGTGGGGCCTGCCATTATCCCAATGCAGG  
AGAGAGCAGCGAAGGTGATGAGGTATAGGAGAAGAGGAAGAGGCGCGCTATGACAAGCAAATCCGATACGAGTCCAGAAAAGCT  
TACGCTGAGCTCCGGCCACGGGTAAACGGCCGCTTCGTCAAGGTACCCGAAGCCATGGCGTCGCCATCATCTCCAGCTTTGCCCTA  
TGGTCTTAGTAAACTTCACCTCGGATGGTCCGG**TAA**

>TaVRN2\_B\_ORF\_212 aa

MSMSCGLCGANNC PRLMVSP IHHRRHHH QEHLREHQFFAQGNHHHHHGA AVDHPVPPPPANFDHRR  
WTFPHETAAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTISNEAIMTIDEMMVGP  
AHYPTMQERA AKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGPS  
KLHLGWFR

>TaVRN2\_D\_gNOR\_621pb amplified from genomic DNA (cv Norstar), the sequence in obtained after deleting the intron

**ATG**TCCATGTCATGCGGTTTGTGCGGCGCTAACAACCTGCCGCGCCTCATGGTCTCGCCATTTCATCATCGTCATCACCATCATCA  
GGAGCACCAGCTGCGTGAGCACCAGTTCTTCGCCCAAGGCAACCACCACCACCACCAGTGCCACTGCCGCCAGCCAACTTCG  
ACCACAGCAGAACATGGACCACACCATTTTCATGAAACAGCAGCTGCAGGGAGCAGCAGGCTCAGCTGGAGGTGGGCGCAGGC  
GGCCGACCCATGGCTCACCTAGTGCAGCCACC **GGCAAGAGCCACAT** **TGCCATT**TACGGAGGTGCATTCACCAACTATTAG  
CAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGTGGGGCCTGCCATTATCCCAATGCAGGAGAGAGCAGCGAAGGTGA  
TGAGGTATAGGAGAAGAGGAAGAGGCGCGCTATGACAAGCAAATCCGATATGATCCAGAAAAGCTTACGCTGAGCTTCGGCCA  
TGGGTCAACGCCGCTTTGTCAAGGTACCCGAAGCCATGGCGTCGCCATCATCTCCAGCTTCGCCCTATGATCTAGTAAACTTCA  
CCTCGGATGGTCCGG**TAA**

>TaVRN2\_D\_genomic\_NORSTAR\_206 aa

MSMSCGLCGANNC PRLMVSP IHHRRHHH QEHLREHQFFAQGNHHHHH VP LPPANFDHSRTWTFPH  
ETAAAGNSSRLTLEVAGGRPMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTISNEAIMTIDEMMVGP AHYPTM  
QERA AKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAE LRPWNGRFVKVPEAMASPSSPASPYDPSKLHLGW  
FR

>TaVRN2\_D\_gMAN\_621 pb amplified from genomic DNA (cv Manitou), the sequence is obtained after deleting the intron

ATGTCCATGTCATGCGGTTTGTGCGGCGCAACAACCTGCGCGCCTCATGGTCTCGCCCATTCATCATCGTCATCACCATCATCA  
GGAGCACCAGCTGCGTCAGCACCAGTTCTTCGCCCAGGCAACCACCACCACCACCAGTGCCACTGCCGCGCAGCCAACTTCG  
ACCATAGCAGAACATGGACCACACCATTTCATGAACAGCAGCTGCAGGGAACAGCAGCAGGCTCACGCTGGAGGTGGGCGCAGGC  
GGCCGACCCATGGCTCACCTAGTCAGCCACC **GCCAGAGCCACAT** **TCCCATTT** TACGGAGGTGCATTCACCAACACTATTAG  
CAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGTGGGGCCTGCCATTATCCACAATGCAGGAGAGAGCAGCGAAGGTGA  
TGAGGTATAGGGAGAAGAGGAAGAGGCGCGCTATGACAAGCAAATCAGATACGAGTCCAGAAAAGCTTACGCTGAGCTTCGGCCA  
CGGGTCAACGGCTGCTTTGTCAAGGTACCCGAAGCCATGGCGTCGCCATCATCTCCAGCTTCGCCCTATGATCTAGTAAACTTCA  
CCTCGGATGGTCCGGTAA

>TaVRN2\_D\_genomic\_MANITOU\_206 aa

MSMSCGLCGANNCPRMLVSPIHRRHHHHQEHQLRQHQQFAQGNHHHHHPVPLPPANFDHSRTWTTPFH  
ETAAAGNSSRLTLEVAGGRPMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTNISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTM  
QERAAKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGCFVKVPEAMASPSSPASPYDPSKLHLGW  
FR

### Comparison between four proteins sequences

>TaVRN2\_A\_ORF\_213 aa

MSMSCGLCGANNCPRMLVSPIHRRHHHHQEHQLREHQQFAQGNHHHHHGAAVDHPVPPPPANFDHRTWTTPFHE  
TAAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTNISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMR  
YREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGPSKLHLGWFR

>TaVRN2\_B\_ORF\_212 aa

MSMSCGLCGANNCPRMLVSPIHRRHHHHQEHQLREHQQFAQGNHHHHHGAAVDHPVPPPPANFDHRTWTTPFHET  
AAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTNISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRY  
REKRKRRRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGPSKLHLGWFR

>TaVRN2\_D\_gNOR\_206 aa

MSMSCGLCGANNCPRMLVSPIHRRHHHHQEHQLREHQQFAQGNHHHHHPVPLPPANFDHSRTWTTPFHETAAAGNS  
SRLTLEVAGGRPMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTNISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKR  
RRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGRFVKVPEAMASPSSPASPYDPSKLHLGWFR

>TaVRN2\_D\_gMAN\_206 aa

MSMSCGLCGANNCPRMLVSPIHRRHHHHQEHQLRQHQQFAQGNHHHHHPVPLPPANFDHSRTWTTPFHETAAAGNS  
SRLTLEVAGGRPMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTNISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKR  
RRYDKQIRYESRKAYAE LRPRVNGCFVKVPEAMASPSSPASPYDPSKLHLGWFR

**CLUSTAL FORMAT for T-COFFEE Version\_1.41, CPU=5.14 sec, SCORE=47,  
Nseq=4, Len=213**

**Zinc Finger Domain**

```

TaVRN2_A_ORF_213  MSMSGLCGANNCPRLMVSPFIHHHHHHQHQLREHQFFAQGNHHHHHGAVDHPVPPP
TaVRN2_B_ORF_212  MSMSGLCGANNCPRLMVSPFIHHHHHHQHQLREHQFFAQGNHHHHHGAVDHPVPPP
TaVRN2_D_gNOR_206  MSMSGLCGANNCPRLMVSPFIHHHHHHQHQLREHQFFAQGNHHHHH-----PVPLP
TaVRN2_D_gMAN_206  MSMSGLCGANNCPRLMVSPFIHHHHHHQHQLREHQFFAQGNHHHHH-----PVPLP
*****
*****

TaVRN2_A_ORF_213  PANFDHRRRTWTFPHETAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTN
TaVRN2_B_ORF_212  PANFDHRRRTWTFPHETAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTN
TaVRN2_D_gNOR_206  PANFDHSRTWTFPHETAAGNSSRLTLEVAGGRPMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTN
TaVRN2_D_gMAN_206  PANFDHSRTWTFPHETAAGNSSRLTLEVAGGRPMAHLVQPPARAHIVPFYGGAFNTN
*****
*****

                                CCT Domain

TaVRN2_A_ORF_213  ISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAELRPR
TaVRN2_B_ORF_212  ISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAELRPR
TaVRN2_D_gNOR_206  ISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAELRPW
TaVRN2_D_gMAN_206  ISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRKAYAELRPR
*****
*****

TaVRN2_A_ORF_213  VNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGPSKLHLGWFR
TaVRN2_B_ORF_212  VNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGPSKLHLGWFR
TaVRN2_D_gNOR_206  VNGRFVKVPEAMASPSPASPYDPSKLHLGWFR
TaVRN2_D_gMAN_206  VNGCFVKVPEAMASPSPASPYDPSKLHLGWFR
*****
*****

```

**Construction of TaVRN2\_B in pTrc-HIS\_B**

**>Clone 3\_Vec-pTrc-HIS\_B**

```

ATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGT
ACGACGATGACGATAAGGATCCTATGTCATGTCATGCGGTTGTGCGGCGCTAACAACTGCCCGCGCCTCATGGT
CTCGCCCATTCATCATCGTCATCACCATCATCAGGAGCACCAGCTGCGTGAGCACCAGTCTCTCGCCCAAGGCAAC
CACCACCACCACCATGGCGCGGCAGTAGACCACCCAGTGCCACCGCGCCAGCCAATTGACCACCGCAGAACAT
GGACTACACCATTTTCATGAAACAGCAGCTGCAGGGAACAGCAGCAGGCTCACACTGGAGGTGGGCGCAGGCGCCG
ACACATGGCTCACCTAGTGACGCCACCGCAAGAGCCACATCGTGCCATTTTATGGAGGTGCATTACAAACACT
ATTAGCAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGTGGGCGCTGCCATTATCCACAAATGCAGGAGA
GAGCAGCGAAGGTGATGAGGTATAGGGAAGAGGAAGAGGCGGCGCTATGACAAGCAAATCCGATACGAGTCCAG
AAAAGCTTACGCTGAGCTCCGGCCACGGGTAAACGGCCGCTTCGTCAAGGTACCGAAGCCATGGCGTCGCCATCA
TCTCCAGCTTTGCCCTATGGTCTAGTAACTTCACCTCGGATGGTTCCGGTAA

```

HisTag from pTrc-His\_B plus de coding sequence of TaVRN2\_B\_245 aa

```

MGGSHHHHHHGMASMTGGQOMGRDLYDDDDKDPMSMSGLCGANNCPRLMVSPFIHHHHHHQHQLRE
HQFFAQGNHHHHHGAVDHPVPPPPANFDHRRRTWTFPHETAAGNSSRLTLEVAGGRHMAHLVQPP
ARAHIVPFYGGAFNTNISNEAIMTIDTEMMVGPAHYPTMQERAAKVMRYREKRKRRRYDKQIRYESRK
AYAELRPRVNGRFVKVPEAMASPSSPALPYGPSKLHLGWFR

```



## TaVRN2\_genomic\_NORSTAR\_1871pb (La partie en jaune est l'intron)

ATG TCCATGTCATGCGGTTTGTGCGGCGCTAACAACTGCCGCGCCTCATGGTCTCGCCCATTCATCATCGTCATCACCATCATCA  
 GGAGCACCAGCTGCGTGAGCACCAGTTCTTCGCCCAAGGCAACCAACCACCACCACCAGTGCCACTGCCGCCAGCCAACCTTCG  
 ACCACAGCAGAACATGGACCACACCATTTTCATGAAACAGCAGCTGCAGGGAACAGCAGCAGGCTCAGCGTGGAGGTGGGCGCAGGC  
 GGCCGACCCATGGCTCACCTAGTGACGCCACC **GGCAGAGCGCGCATC** GTAAGTAGTAGTACCGCTTAATTGTTTCATCTCTTGCC  
 GATGGATGCGTCCCTGGCTTCCTCCTTAAAAATCCCCACCTAATTTATGTCCATCTATACCCACTACAAAAAATAGCACCATGTA  
 ACCATCTCATATATCTGTACATAATTCTGTTAATGTACGCTGCTCAATTGTTCTCCTGAAAAAGATATGCGGGAATGGATCTTGA  
 TATTCCTTTAATTTTCTATGGAGGCATATATAGAGTTTGTGTTTGTATTAGTTGATGCAGAAATGTTATGGGTTGTCAAATCATCAG  
 TCATACATATAAACTTATTTCAATTTTATTTGACCAACAACAAGGTAATCAGTCATACATGCATACTGAAAATTTGACTTGTGTTCA  
 ATAACTAACCAACTCGACCGGCACAGCTGGGGGAAGACTTTAATCAAGCTGCTAGCTAGAGCTTAATAATATAACATATCTCTTTA  
 TGGGATCAAGCAATACATATGCGCTCAATTCTCAACTTGTCAATATCTATCTGGAGTCCACACTTTATGGTAATTAATTGACAAAG  
 TTTTGTGAAATGGACAATATACATACTGGATCGATGCACCCCTTTTCTCATTTTATGTGGTCATTATGAATTTGATTGTTATTTAA  
 TATTTCAATTTTATCTTGAGCTAGTTTTCGAAGTCTGTAGCTCATATATACTGATACTACTCCCCACGATAGCTTGGGTAGTGGC  
 CGGGTGATCGATCTACCGAGTTCATAAACTGATCGAGATCGGGTCCAAAAAGAACAACCCATACAAAATGGAAGAAGATCCT  
 TGTTTAGTTAGTTTGCATCAGAAAAATGCGCTAATTAGTTACTTGGCTATCAATCTTTTGAACATGGCATGTTACCCCCAAACGGAC  
 CAGATCACAATTATTGATGAAGTTACGCCCTTTTAAAACTCATAACTGTACATACATGTACAGGGCTACACACATGTACATAAT  
 ACACCTAATTAACGATATATTCGTAGACCAATTGTTTGGACGGTGGCGCATCTTTGAAAAAATGCCAGAGGAGTTGTTAGCT  
 TCCACTGTCCAGAAATAGAAATAGTTACAATCAAGTGCATCTCTGAATGAAATGGATCATTTTCTAGTTAATTAGAGACCAATTAG  
 ATACTTCATAAACAGGGGAGTATCAAGTACGTATCTGCTACCTAAGAAAGTACATAACTGCGATCTTATGATTATTTCTCTTGG  
**ATGTTTCACTGGCATT** TACGGAGGTGCATTACCAACACTATTAGCAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGT  
 GGGCCTGCCATTATCCCAATGCAGGAGAGAGCAGCGAAGGTGATGAGGTATAGGAGAAGAGGAAGAGGCGCGCTATGACAA  
 GCAATCCGATATGAGTCCAGAAAAGCTTACGCTGAGCTTCGGCCATGGGTCAACGGCGCTTTGTCAAGGTACCCGAAGCCATG  
 CGTCGCCATCATCTCCAGCTTCGCCCTATGATCCTAGTAACTTCACCTCGGATGGTTCCGGTAA

## TaVRN2\_genomic\_MANITOU\_1872pb (La partie en jaune est l'intron)

ATG TCCATGTCATGCGGTTTGTGCGGCGCAACAACCTGCCGCGCCTCATGGTCTCGCCCATTCATCATCGTCATCACCATCATCA  
 GGAGCACCAGCTGCGTCAGCACCAGTTCTTCGCCCAAGGCAACCAACCACCACCACCAGTGCCACTGCCGCCAGCCAACCTTCG  
 ACCATAGCAGAACATGGACCACACCATTTTCATGAAACAGCAGCTGCAGGGAACAGCAGCAGGCTCAGCGTGGAGGTGGGCGCAGGC  
 GGCCGACCCATGGCTCACCTAGTGACGCCACC **GGCAGAGCGCGCATC** GTAAGTAGTAGTACCGCTTAATTGTTTCATCTCTTGCC  
 GATGGATGCGTCCCTGGCTTCCTCCTTAAAAATCCCCACCTAATTTATGTCCATCTATACCCACTACAAAAAATAGCACCATGTA  
 ACCATCTCATATATCTGTACATAATTCTGTTAATGTACGCTGCTCAATTGTTCTCCTGAAAAAGATATGCGGGAATGGATCTTGA  
 TATTCCTTTAATTTTCTATGGAGGCATATATAGAGTTTGTGTTTGTATTAGTTGATGCAGAAATGTTATGGGTTGTCAAATCATCAG  
 TCATACATATAAACTTATTTCAATTTTATTTGACCAACAACAAGGTAATCAGTCATACATGCATACTGAAAATTTGACTTGTGTTCA  
 ATAACTAACCAACTCGACCGGCACAGCTGGGGGAAGACTTTAATCAAGCTGCTAGCTAGAGCTTAATAATATAACATATCTCTTTA  
 TGGGATCAAGCAATACATATGCGCTCAATTCTCAACTTGTCAATATCTATCTGGAGTCCACACTTTATGGTAATTAATTGACAAAG  
 TTTTGTGAAATGGACAATATACATACTGGATCGATGCACCCCTTTTCTCATTTTATGTGGTCATTATGAATTTGATTGTTATTTAG  
 TATTTCAATTTTATCTTGAGCTAGTTTTCGAAGTCTGTAGCTCATATATACTGATACTACTCCCCACGATAGCTTGGCTAGTGGC  
 CGGGTGATCGATCTACCGAGTTCATAAACTGATCGAGATCGGGTCCAAAAAGAACAACCCATACAAAATGGAAGAAGATCCT  
 TGTTTAGTTAGTTTGCATCAGAAAAATGCGCTAATTAGTTACTTGGCTATCAATCTTTTGAACATGGCATGTTACCCCCAAACGGG  
 CTCAGATCACAATTATTGATGAAGTTACGCCCTTTTAAAACTCATAACTGTACATACATGTACAGGGCTACACACATGTACATA  
 ATACACCTAATTAACGATATATTCGTAGACCAATTGTTTGGACGGTGCACATCTTTGAAAAAATGCCAGAGGAGTTGTTAGC  
 TCCACTGTCCAGAAATAGAAATAGTTACAATCAAGTGCATCTCTGAATGAAATGGATCATTTTCTAGTTAATTAGAGACCAATTA  
 GATACTTCATAAACAGGGGAGTATCAAGTACGTATCTGCTACCTAAGAAAGTACATAACTGCGATCTTATGATTATTTCTCTT  
**GATGTTTCACTGGCATT** TACGGAGGTGCATTACCAACACTATTAGCAATGAAGCAATCATGACTATTGACACAGAGATGATGGT  
 GGGCCTGCCATTATCCCAATGCAGGAGAGAGCAGCGAAGGTGATGAGGTATAGGAGAAGAGGAAGAGGCGCGCTATGACA  
 AGCAATCAGATACGAGTCCAGAAAAGCTTACGCTGAGCTTCGGCCACGGGTCAACGGCTGCTTTGTCAAGGTACCCGAAGCCATG  
 CGTCGCCATCATCTCCAGCTTCGCCCTATGATCCTAGTAACTTCACCTCGGATGGTTCCGGTAA

## Isolation de gènes TaMADS-box

Un des buts de ce projet était d'isoler des gènes MADS-box du blé hexploïde à partir de bibliothèques d'ADN complémentaire. MADS désigne l'acronyme pour les premiers membres identifiés de cette famille : M pour le gène de levure *Minichromosome maintenance 1* (Ammerer, 1990), A pour *AGAMOUS* chez *Arabidopsis* (Yanofsky et al., 1990), D pour *DEFICIENS* chez *Antirrhinum* (Sommer et al., 1990) et S pour *Serum Response Factor* chez l'Humain (Norman et al., 1988). Leur organisation structurale identifie en plus du domaine MADS une région intermédiaire (I), un domaine K et les extrémités terminales (Annexe, figure1). L'extrémité N-terminal est à prédominance hydrophile et une partie de cette région serait nécessaire à la spécificité de liaison sur l'ADN (Shore et Sharrocks, 1995).

Suite au séquençage et à l'annotation complète des gènes de *Arabidopsis*, plusieurs parutions chiffrent le nombre de gènes MADS-box à 107 (Parenicova et al., 2003). Quant au séquençage et à l'annotation incomplète du génome du riz on identifiait 71 membres de la famille MADS-box (Goff et al., 2002). Cependant ce nombre pourrait, être revu à la hausse une fois l'annotation complétée alors que chez le blé le séquençage n'a pas encore commencé.

### 2.1 Criblage des banques d'ADN complémentaires

Différentes banques d'ADNc construites selon Gateway<sup>TM</sup> de BRL-Life Technologies à partir d'ARNm polyA(+) de blé Norstar non acclimaté et acclimaté ont été développées dans le cadre du projet FGAS (Danyluk et Sarhan, communication personnelle). Les bouts d'ADNc ont été synthétisés à partir des ARNm auxquels sont liés des adaptateurs de deux sites de restrictions (*Not I* et *Sal I*), puis ils sont introduits de manière asymétrique dans le vecteur pCMV-SPORT 6 qui porte des sites de recombinaison (*attB1* et *attB2*). Ces banques d'ADNc directionnelles ont été criblées avec différentes sondes spécifiques marquées au <sup>32</sup>P pour identifier de nouveaux membres TaMADS.

## 2.2 Criblage à partir des bases de données d'ESTs publiques

Un des objectifs du projet FGAS a permis de générer environ 80 000 ESTs à partir de banques d'ADNc de blé d'hiver acclimaté au froid. Les programmes bioinformatiques ont permis de rechercher des motifs conservés et d'effectuer des analyses par homologie de séquences afin d'identifier de nouveaux TaMADS. En plus de la collection FGAS, les bases de données publiques ont été criblées à la recherche des bouts de séquences (ESTs). Toutes les nouvelles séquences ont été assemblées pour former des séquences contiguës (ou *contigs*) complètes en utilisant des programmes bioinformatiques. La reconstruction de séquences contiguës a permis de disposer des informations de séquences des gènes TaMADS. De ce fait, un premier tri de gènes et d'ESTs, codant pour des protéines TaMADS partielles ou complètes, a permis de distinguer différents membres et copies de gènes.

## 2.3 Clonage par PCR et séquençage

Par PCR, les membres *TaMADS* ont été amplifiés à l'aide d'oligonucléotides spécifiques à chaque gène à partir de différentes banques d'ADNc. Les fragments obtenus ont été clonés puis leur identité confirmée par séquençage.



**Table 1:** MADS-box genes isolated by PCR amplification from cDNA library of hexaploid cv Norstar. Data were obtained after BLAST the sequences against NCBI public data bases. (At: *Arabidopsis thaliana* the plant model)

| Number | Name / size aa         | hit   | Homology with At    |
|--------|------------------------|---|---------------------|
| 1      | MC14FIL7-9 / 228       | <a href="#">&gt;gi 29372770 emb CAD23439.1  putative MADS-domain transcription factor [Zea mays]</a>          | SVP-like            |
| 2      | MC10FIL6-19 / 208      | <a href="#">&gt;gi 13274182 emb CAC33850.1  putative MADS-domain transcription factor [Zea mays]</a>          | PISTILLATA          |
| 3      | MC10FIL6-22 / 157      | <a href="#">&gt;gi 7446535 pir T03902 MADS4 box protein - rice</a>  | PI/GLO-like protein |
| 4      | MC16FIL6-56 / 197      | <a href="#">&gt;gi 5295988 dbj BAA81885.1  MADS box-like protein [Oryza sativa]</a>                           | AGL14               |
| 5      | MC21FIL7-85 / 229      | <a href="#">&gt;gi 3688593 dbj BAA33459.1  MADS box transcription factor [Triticum aestivum]</a>              | AP3 / TaMADS#51     |
| 6      | MC21FIL7-88 / 201      | <a href="#">&gt;gi 16417764 gb AAL18851.1 AF424549.1 MADS-box protein SPW1 [Oryza sativa]</a>                 | AP3                 |
| 7      | MC22FIL7-94 / 229      | <a href="#">&gt;gi 3688593 dbj BAA33459.1  MADS box transcription factor [Triticum aestivum]</a>              | AP3 / TaMADS#51     |
| 8      | MC26FIL1-108 / 222     | <a href="#">&gt;gi 9367313 emb CAB97354.1  MADS-box protein 8 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]</a>            | API-Like 77% MADS11 |
| 9      | MC34FIL7-154 / 276     | <a href="#">gi 9367313 emb CAB97354.1  MADS-box protein 8 [Hordeum vulg... 311</a>                            | API-Like            |
| 10     | MC58RIL1-122 / 246     | <a href="#">&gt;gi 9367315 emb CAB97355.1  MADS-box protein 9 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]</a>            | AGL9                |
| 11     | MC58RIL8-127 / 222     | <a href="#">&gt;gi 5295990 dbj BAA81886.1  MADS box-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]</a> | SOC1 / AGL20        |
| 12     | MC47RIL7-140 / 254     | <a href="#">&gt;gi 24636577 dbj BAC22939.1  MADS box transcription factor [Triticum aestivum]</a>             | AGAMOUS             |
| 13     | MC18RIL1-143 / 254     | <a href="#">&gt;gi 24636577 dbj BAC22939.1  MADS box transcription factor [Triticum aestivum]</a>             | AGAMOUS             |
| 14     | MC65RIL7-145 / 254     | <a href="#">&gt;gi 24636577 dbj BAC22939.1  MADS box transcription factor [Triticum aestivum]</a>             | AGAMOUS             |
| 15     | MC29FIL1 / 157         | <a href="#">gi 40644784 emb CAE53900.1  putative MADS box-like protein ... 307</a>                            | AGL14               |
| 16     | MC61R1-L1-L1 / 226     | <a href="#">gi 9367234 emb CAB97350.1  MADS-box protein 1-2 [Hordeum vu... 407</a>                            | AGL24               |
| 17     | MC46F1-L1 / 196        | <a href="#">gi 40644782 emb CAE53899.1  putative transcription factor M... 352</a>                            | AGL8                |
| 18     | MC44F1-L1 / 198        | <a href="#">gi 40644782 emb CAE53899.1  putative transcription factor M... 330</a>                            | AGL8                |
| 19     | MC32R1-L1 / 157        | <a href="#">gi 40644784 emb CAE53900.1  putative MADS box-like protein ... 307</a>                            | AGL14               |
| 20     | MMC 14FIL74 / 228      | <a href="#">gi 29372770 emb CAD23439.1  putative MADS-domain transcript... 402</a>                            | AGL24               |
| 21     | MMC 8FIL7-18 / 252     | <a href="#">gi 29372770 emb CAD23439.1  putative MADS-domain transcript... 402</a>                            | PISTILLATA          |
| 22     | MMC 8FIL7-16 / 208     | <a href="#">gi 45356041 dbj BAD12461.1  PISTILLATA-like MADS box(blé) protei... 420</a>                       | PISTILLATA          |
| 23     | MMC 42FIL1-11 / 167    | <a href="#">gi 29372770 emb CAD23439.1  putative MADS-domain transcript... 375</a>                            | AGL24               |
| 24     | 4-jd-AP2-R1 / 166      | <a href="#">gi 40644784 emb CAE53900.1  putative MADS box-like (BLE)protein ... 204</a>                       | AGAMOUS             |
| 25     | MMC 65FIL7-101 / 237   | <a href="#">gi 3688593 dbj BAA33459.1  MADS box transcription factor [T... 414</a>                            | AP3                 |
| 26     | MC 29FIL1-2-63-3 / 165 | <a href="#">gi 40644784 emb CAE53900.1  putative MADS box-like protein ... 271</a>                            | AGL14               |
| 27     | MC29FIL1-2-63-2 / 166  | <a href="#">gi 40644784 emb CAE53900.1  putative MADS box-like protein ... 307</a>                            | AGL14               |

|    |                         |   |                        |
|----|-------------------------|---|------------------------|
| 28 | MC 51R1-L1 / 196        | <a href="#">gil40644782 emb CAE53899.1</a> putative transcription factor M... 345 | AGL18                  |
| 29 | MC Bj313725-R1-L1 / 159 | <a href="#">gil40644784 emb CAE53900.1</a> putative MADS box-like protein ... 255 | AGL79                  |
| 30 | MC Bj230548-R1-L1 / 165 | <a href="#">gil51091146 dbj BAD35842.1</a> putative transcription factor M... 261 | AGL24                  |
| 31 | MC 87-R1-L1 / 188       | <a href="#">gil50940449 ref XP_479752.1</a> putative MADS-box protein FDRM... 283 | AGL3-II / AGL21        |
| 32 | MC 87-F1-L1 / 191       | <a href="#">gil21586457 gb AAM55472.1</a> MADS-box protein FDRMADS3 [Oryza... 228 | AGL12                  |
| 33 | MC 78-R1-L1 / 165       | <a href="#">gil51091146 dbj BAD35842.1</a> putative transcription factor M... 258 | AGL24                  |
| 34 | MC 61-R1-L1-1 / 226     | <a href="#">gil9367234 emb CAB97350.1</a> MADS-box protein 1-2 [Hordeum vu... 407 | AGL24                  |
| 35 | MC 60-R1-L1-2 / 229     | <a href="#">gil9367234 emb CAB97350.1</a> MADS-box protein 1-2 [Hordeum vu... 363 | AGL24                  |
| 36 | MC 32 R1-L1 / 166       | <a href="#">gil40644784 emb CAE53900.1</a> putative MADS box-like protein ... 307 | AGL14                  |
| 37 | MC 69-F1-L7-1 / 262     | <a href="#">gil33621123 gb AAQ23145.1</a> transcription factor MADS56 [Ory... 187 | At2g45660/F17K2.19/soc |
| 38 | MCF 44-F1-L1 / 238      | <a href="#">gil40644782 emb CAE53899.1</a> putative transcription factor M... 345 | AGL8                   |
| 39 | MC 46-F1-L1 / 196       | <a href="#">gil40644782 emb CAE53899.1</a> putative transcription factor M... 352 | AGL8                   |
| 40 | WEF 45G05 / 224         | <a href="#">gil50940449 ref XP_479752.1</a> putative MADS-box protein FDRM... 407 | AGL12                  |
| 41 | WEF 42G17 / 167         | <a href="#">gil40644784 emb CAE53900.1</a> putative MADS box-like protein ... 256 | AGL79                  |
| 42 | WEF 31K05 / 228         | <a href="#">gil29372770 emb CAD23439.1</a> putative MADS-domain transcript... 284 | AGL24                  |
| 43 | WEF 73C21 / 157         | <a href="#">gil40644784 emb CAE53900.1</a> putative MADS box-like protein ... 120 | At2g45660/F17K2.19/soc |